

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Botanika



Bc. Klára Ondříčková

Význam hybridizace v evoluci rodu *Sorbus*
Importance of hybridization in genus *Sorbus* evolution

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré informační zdroje a literaturu. Tato práce ani žádná její část nebyla použita k získání jiného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2018

Klára Ondříčková

Poděkování:

Mé největší poděkování patří mému školiteli, Tomáši Urfusovi, za nikdy nekončící optimismus. Dále bych chtěla poděkovat Janče, Lence a všem ostatním botanikům, rodině a přátelům za podporu.

Abstrakt

Biosystematické zhodnocení fakultativně apomiktických skupin jako *Pilosella*, *Rubus* nebo *Sorbus* je z mnoha důvodů velmi problematické. Vymezení taxonů značně komplikují stále probíhající mikroevoluční procesy jako mezidruhová hybridizace, polyploidizace a apomixie. Díky těmto jevům vzniká velké množství geneticky odlišných linií, které jsou různou měrou reprodukčně separovány a na morfologické úrovni vykazují enormní variabilitu. Samotná apomixie může mít řadu modifikací a je obvykle kombinována s dalšími reprodukčními strategiemi.

V rámci rozsáhlé sbírky zástupců převážně středoevropských taxonů rodu *Sorbus* v Dendrologické zahradě v Průhonících byla provedena série hybridizačních experimentů. Zahrnuté stromy byly podrobeny mikrosatelitové analýze pro zpřesnění jejich taxonomické identity. Byla provedena analýza vzniklých semen metodou průtokové cytometrie (Flow cytometric seed screen - FCSS), která umožnila detailně zrekonstruovat způsob jejich vzniku. Byla odhalena značná variabilita reprodukčních způsobů a to i v rámci jednotlivých křížení. Zaznamenáno bylo klasické sexuální rozmnožování (tj. mezidruhová hybridizace), autogamie a různé druhy pseudogamie za účasti redukovaných i neredukovaných gamet mateřské rostliny i námi dodaného otcovského jedince. Dominantní reprodukční způsoby u jednotlivých druhů v přírodě i v experimentu vycházejí ve většině případů velmi podobně. U experimentálních semen byla zaznamenána větší variabilita, a to hlavně díky většímu množství dodaných ploidii donorů pylu, než se v přírodě vyskytují na kontaktních zónách jednotlivých druhů. Hybridizace mezi jednotlivými druhy napříč celým rodem probíhá asymetricky, takže má zásadní význam, který druh je donorem pylu. Potvrdilo se také výlučné postavení *S. aria* agg.

Výsledky experimentálních křížení bylo možné porovnat s řadou publikací, které se zabývaly přirozenou hybridizací v přírodě (morfologické, cytometrické i molekulární studie). Celkové pattern potvrdilo hypotézy z předchozích studií a jasně odhalilo absenci, resp. nedostatečnost, hybridizačních bariér studovaných taxonů.

Klíčová slova: *Sorbus*, hybridizace, polyploidizace, apomixie, experimentální křížení, FCSS, mikrosatelity

Abstract

From a lot of reason it is really complicated to evaluate biosystematically the facultative apomictic groups like a *Pilosella*, *Rubus* or *Sorbus*. How to define the taxons is complicated because of still ongoing microevolutional processes such as inter-specific hybridization, polyploidization and apomixis. Due to these procedures there appear speciations of many genetically different lineages that are separate in the reproduction. They evince an immense variability on the morphological level. The apomixis itself can be modified a lot and it is combined with other reproductive strategies usually.

It was possible to put the hybridization experiments into practice thanks to the huge collection of mainly middle European taxons representatives from genus *Sorbus*, in Dendrology garden in Průhonice. The trees used for the experimental crossing, were inspected to the microsatellite analysis to specify in more detail their membership of taxons identity. The analysis of new-emerged seeds was performed by flow cytometry (Flow cytometric seed screen - FCSS) enabling very quick detection of reproductive pathways, how the seeds were formed. It has been definitely demonstrated, that the variability of the reproductive pathways is very wide, even between each individual crossing. There were detected the conventional sexual reproduction (interspecific hybridization), autogamy and various kinds of pseudogamy, with participation of reduced and unreduced gametes from female plants and by us delivered male species. The dominant reproductive pathways in nature, even in the experiment, are very similar in most cases. The bigger variability was found out in the experimental seeds. It was caused mainly owing to the bigger amount of ploidy donors of pollen delivered by us, than it is occurring on contact zones of the species in the nature. Hybridization between the species across the entire genus takes place asymmetrically. The species, that the donor of the pollen is it has an essential relevance in the choice of reproductive strategy. The exclusive position of *S. aria* agg. has been confirmed too., but it was in lesser degree than previously supposed.

The results of experimental crossing were possible to compare with a number of publications dealing with natural hybridization in nature (morphological, cytometric and molecular studies). The overall pattern confirmed the hypotheses from previous studies and clearly revealed the absence, respectively. deficiency, hybridization barriers of studied taxa.

Klíčová slova: *Sorbus*, hybridization, polyploidization, apomixis, experimental crossing, FCSS, mikrosatelits

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	3
2.1	Rod Sorbus.....	3
2.1.1	Morfologie	3
2.1.2	Ekologie a rozšíření	4
2.1.3	Pojetí druhu.....	4
2.1.4	Vnitrorodové členění	6
2.2	Zdroje variability	8
2.2.1	Hybridizace.....	8
2.2.2	Polyploidizace.....	10
2.2.3	Apomixie.....	12
3	Metodika	13
3.1	Materiál	13
3.1.1	Sběr listů pro mikrosatelitovou analýzu	14
3.1.2	Výběr hybridizací.....	14
3.2	Experimentální hybridizace	14
3.3	Analýza semen metodou průtokové cytometrie (FCSS: Flow Cytometric Seed Screen)	16
3.3.1	Vyhodnocení analýz.....	16
3.4	Mikrosatelity – Molekulární analýza	17
3.4.1	Izolace DNA	18
3.4.2	Multiplexová PCR	18
3.4.3	Příprava na fragmentační analýzu.....	20
3.4.4	Vyhodnocení dat	20
4	Výsledky	21
4.1	Stručně	21
4.1.1	Mikrosatelity	21
4.1.2	Experimentální křížení a FCSS.....	21
4.2	Mikrosatelity	22
4.3	Reprodukční způsoby.....	23
4.3.1	Experimentální křížení.....	23
4.3.2	Reprodukční způsoby v rámci jednotlivých agregátů.....	31
4.3.3	Neredukované gamety	39
5	Diskuze	43
5.1	Shrnutí výsledků	43
5.2	Kontext jiných fakultativně apomiktických skupin	43
5.2.1	<i>Pilosella</i>	43
5.2.2	<i>Hieracium</i>	44
5.2.3	<i>Alchemilla</i>	44

5.2.4	<i>Rubus</i>	44
5.3	Úskalí a výhody metodiky	45
5.3.1	Mikrosatelity	45
5.3.2	Experimentální hybridizace a FCSS	45
5.4	Mentor efekt	46
5.5	Neredukované gamety	47
5.6	Tři centrální jádra	47
5.7	Reprodukční způsoby	47
5.8	Možné navázání	48
6	Závěr	50
	Seznam použité literatury	53
	Příloha 1:	58
	Příloha 2:	59
	Příloha 3:	61

1 Úvod

Studium fakultativně apomiktických skupin rostlin jako jsou například rody *Pilosella*, *Rubus* nebo *Sorbus* je problematické. Jasně taxonomické vymezení komplikují recentně probíhající mikroevoluční procesy jako je mezidruhovná hybridizace, polyploidizace a apomixie (Kovanda 1961; Holub 1995). Vzniká velké množství izolovaných geneticky odlišných linií, často taxonomicky hodnocených na úrovni stenoendemitů. Příkladem může být *S. pauca*, vyskytující se v počtu 14 dospělých jedinců pouze na území Bezdězu (Lepší et al. 2013).

Řešením v rodu *Rubus* bylo vytvoření jasně daných pravidel, kde je morfologická definice doplněna o minimální rozsah areálu (Holub 1995). Dalším příkladem může být rod *Pilosella*, kde byl vytvořen koncept širě pojatých skupin (Bräutigam and Greuter 2007). V rodu *Sorbus* zatím nebyl žádný podobný způsob uplatněn.

Vnitřní taxonomické členění rodu *Sorbus* je tradičně tvořeno pěti skupinami, obvykle hodnocených na úrovni podrodů nebo rodů: *Sorbus*, *Aria*, *Torminaria*, *Cormus*, *Chamaemespilus* (Kovanda 1961; Rich et al. 2010). Vedle těchto základních druhů je rozlišováno a taxonomicky tříděno mnoho hybridogenních druhů, které morfologicky odpovídají kombinaci svých rodičů (Kovanda 1999). Velikost jejich areálů ale není určující pro definici druhu jako u výše zmíněného rodu *Rubus* (Holub 1995). Kvůli tomu se můžeme setkat s druhy jak na úrovni stenoendemitů, tak i se širokým areálem souvisejícím zřejmě se stářím takových druhů. Hybridogenní druhy jsou tedy třízeny pouze na základě kombinace rodičovských druhů a to na: *S. latifolia* agg. (*S. aria* agg. × *S. torminalis*), *S. hybrida* agg. (*S. aria* agg. × *S. aucuparia*) a *S. sudetica* agg. (*S. aria* agg. × *S. chamaemespilus*) (Kovanda 1999). Tento systém neodpovídá skutečné variabilitě a komplexnosti rodu *Sorbus* a neumožňuje určení a zařazení známých trihybridů a složitějších hybridních linií (Lepší et al. unpubl.).

Hybridogenní linie kombinují mnoho reprodukčních způsobů a vedle apomiktických, mají často zachovanou i schopnost sexuálního rozmnožování, jsou tedy fakultativně apomiktictí (Whitton et al. 2008). Dalším typem asexuální reprodukce je také vegetativní hřížení a to u *S. sudetica* agg., jeho rodičovských druhů (*S. aria* a *S. chamaemespilus*), *S. hybrida* a *S. danubialis*. V posledních letech se díky moleku-

lárními metodám, průtokové cytometrií a mnohorozměrné morfologické analýze daří revidovat často chybné závěry předchozích studií.

Tato práce je zaměřena na studium mikroevolučních procesů v rodu *Sorbus* a to zejména hybridizace a reprodukční strategie. To bylo možné díky navázání spolupráce s Výzkumným ústavem Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví a možnosti využití jejich rozsáhlé sbírky středoevropských druhů jeřábů v prostorách Dendrologické zahrady v Průhonicích. Hlavním cílem bylo metodou experimentálního křížení a následné analýzy vzniklých semen metodou průtokové cytometrie (Flow cytometric seed screen – FSCC) zjistit možné kombinace jednotlivých druhů a jejich reprodukční způsoby a zjištěné výsledky porovnat s dosud udávanými výsledky molekulárních analýz.

Kladené otázky:

- 1) Které potenciální hybridní kombinace v rodu *Sorbus* jsou plodné?
- 2) Je hybridizace vybraných druhů symetrická nebo jednosměrná?
- 3) Kříží se hybridogenní taxony zpětně s oběma rodičovskými druhy?
- 4) Liší se potomstvo experimentální hybridizace variací cytotypů ve srovnání se situací v přírodě?

2 Literární přehled

2.1 Rod *Sorbus*

Rod *Sorbus* L. patří do čeledi *Rosaceae*. Základním chromozomovým chromozomovým číslem rodu *Sorbus* je $x=17$. Do nedávné doby byl dále řazen do podčeledi *Maloideae* (Campbell et al. 1995). Dle současné fylogenetické studie je ale řazen do podčeledi *Rosoideae*, tribu *Malinae* (Zhang et al. 2017). Vnitřní členění rodu je stále předmětem výzkumu. Běžně užívané rozdělení do jednotlivých agregátů určil výzkum Challice a Kovandy (1978), které dále podpořily další studie (Campbell 1995, Verbylaite et al. 2006).

2.1.1 Morfologie

Jeřáby jsou převážně dřeviny, stromy nebo keře. Jejich větve jsou bez trnů a s hladkou kůrou. Listy mají častěji jednoduché, někdy lichozpeřené, oválné, vejčité až obvejčité s různě zubatým okrajem. Květy jsou oboupohlavné, primárně pentamerní. Koruna je bílá, nažloutlá nebo narůžovělá barvy. Tyčinky jsou volné ve třech kruzích. Gyneceum je velmi variabilní: nejen napříč druhy, ale i v rámci jednoho jedince. Může být ze dvou až pěti plodolistů. Květenstvím je chocholičnatá lata s velmi rozdílným počtem květů podle druhů. V době kvetení často nepřitažlivě voní.

Plodem jeřábů jsou malvice. Jsou dužnaté, oranžové až červené barvy (kultivary mohou být i bílé nebo žluté), kulaté až oválné. Jejich velikost, barva, struktura i tvar se liší podle jednotlivých druhů. (Kovanda, 1961a, 1992; Warburg and Kárpáti, 1968; Májovský, 1992; Rich et al., 2010).



Obř. 1: Plodem jeřábů jsou malvice. Jeřáby jsou dřeviny, květenstvím je chocholičnatá lata a plodem jsou dužnaté oranžové až červené malvice.

Všechny druhy rodu jsou opylovány hmyzem. Reprodukční strategie jsou velmi variabilní na úrovni každého jedince. Plody se rozšiřují endozoochorně (Kovanda, 1992, Rich et al. 2010).

2.1.2 Ekologie a rozšíření

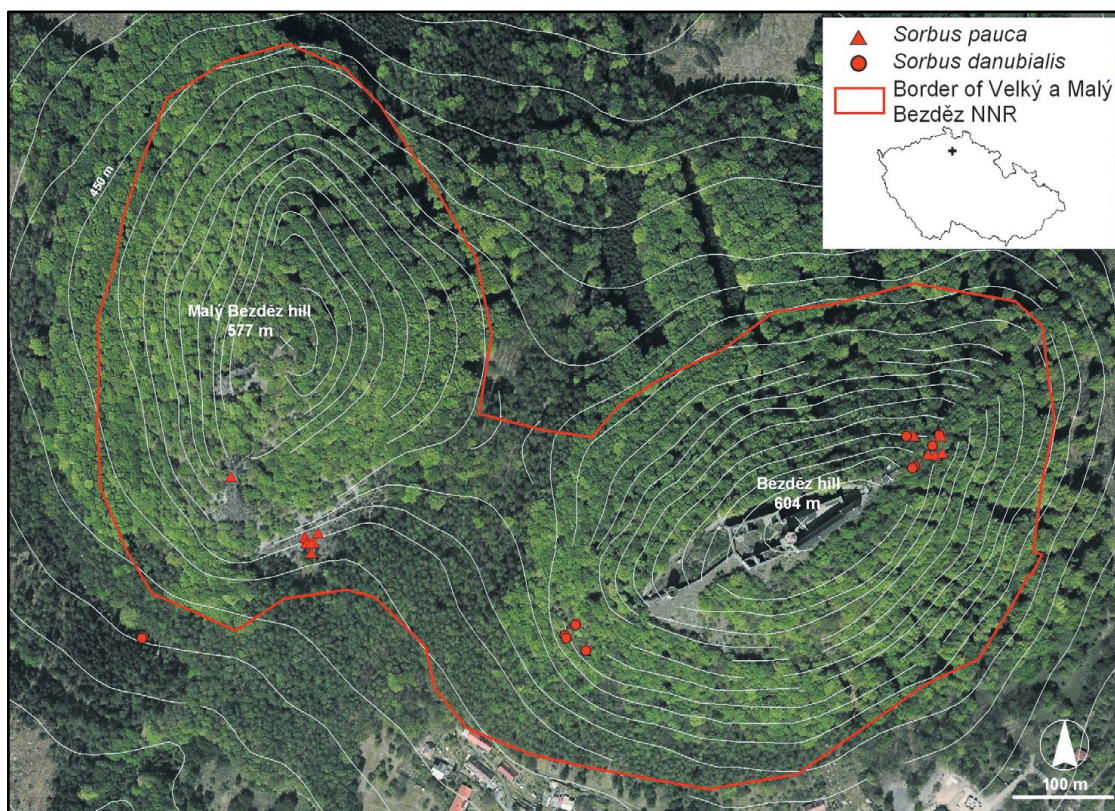
Většina druhů rodu *Sorbus* je heliofilní. Vyskytují se tedy převážně na skalních výchozech, skalách, v křovinách a dubových lesích. Výjimku tvoří lesní *S. torminalis* a někteří kříženci tohoto druhu. Všechny druhy jsou schopné růst i v zastínění, ale jejich růst a kvetení bývá utlumeno (Rich et al. 2010).

Rod *Sorbus* je rozšířen v mírném páru severní polokoule s centrem diverzity v Eurasii. V Americe se vyskytuje pouze podrod *Sorbus*. Mikroevoluce v rámci Evropy a v rámci Asie probíhá odlišně. Asijské druhy jsou převážně sexuální, zatímco evropské většinově alespoň fakultativně apomiktické. (Kovanda 1959, Meusel et al. 1965, Warburg and Kárpáti 1968, Kutzelnigg 1994).

2.1.3 Pojetí druhu

Druhový koncept v rámci rodu *Sorbus* je stejně jako u jiných agamických skupin velmi komplikovaný a značně dynamický vzhledem k stále probíhající mikroevoluci a aktuálně velké pozornosti vědeckých týmů.

Jedním z často uváděných příkladů řešení je stanovení pravidel pro určení taxonomické úrovně v rámci rodu *Rubus* (L.). Kromě tradičního morfologického vymezení je brán zřetel na rozlohu areálu. Rozlišují se tedy lokální typy (do velikosti areálu 20km v nejdelším směru), regionální druhy (mezi 20 a 350km, z taxonomického hlediska plnohodnotné druhy) a běžné druhové linie s areálem větším 350km (Holub, 1995). Takové pojetí u rodu *Sorbus* není. Druhový statut mají i velmi malé stenoendemické druhy, jako například známý bezdězský *S. pauca*, který se vyskytuje v počtu pouhých 14 dospělých jedinců za svazích Velkého a Malého Bezdězu (Obr 2.; Lepší et al. 2013).



Obr. 2: Lokalita stenoendemického *S.pauca* (převzato z Lepší et al. 2013). Taxonomické hodnocení jednotlivých linií rodu *Sorbus* nemá jasné hranice. Proto jsou některé izolované linie popisovány jako samostatné druhy. Jedním z případů je *S.pauca*, který se vyskytuje v počtu 14 dospělých jedinců pouze na Velkém a Malém Bezdězu.

Dalším příkladem vyřešení pojetí taxonomie složité skupiny může být rod *Pilosella*. Kvůli velké variabilitě reprodukčních strategií, velmi živé hybridizaci a popisování stále nových druhů bylo rezignováno na užší druhový koncept a byl vytvořen soubor širěji pojatých skupin (Bräutigam and Greuter 2007). Takové řešení by bylo možná vhodnou inspirací i pro rod *Sorbus*.

Morfologické určení druhů v rámci rodu *Sorbus* není vůbec snadné, protože existuje velká variabilita i v rámci jednoho druhu (např.: Bílá 2015). Hybridogenní druhy, kterých je velké množství, kombinují morfologické znaky rodičů. Proto v minulosti docházelo k vyvozování chybných taxonomických závěrů, které jsou v posledních letech díky novým metodám revidovány (Campbell and Dickinson 1990; Kovanda 1999; Bernátová and Májovský 2003; Lepší et al. 2008; Lepší et al. 2015).

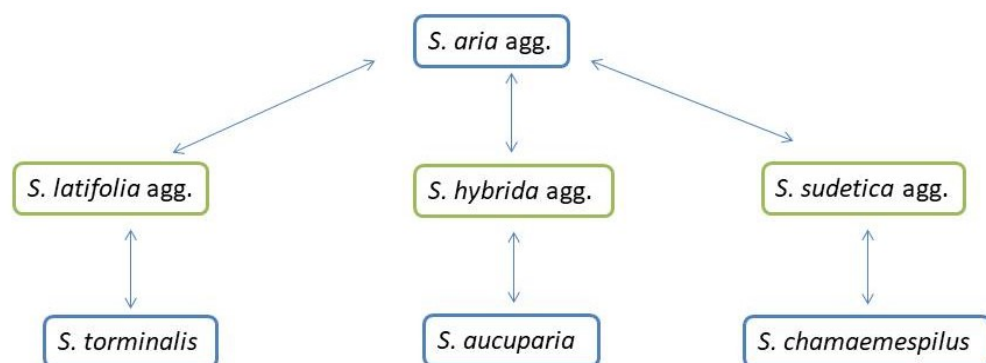
2.1.4 Vnitrorodové členění

Na základě výše zmíněného je jasné, že dokonalé vnitřní členění rodu neexistuje. Kromě základních sexuálních druhů je od minulého století popisováno velké množství hybridogenních druhů, které nelze vždy do vytvořených konceptů jednoznačně zařadit. Dále je také na základě molekulárních studií běžné dříve popsané taxony rušit. (Kovanda 1999; Bernátová and Májovský 2003; Lepší et al. 2008, 2009, 2013, 2015; Rich et al. 2014)

Běžně je užíván koncept rozdělení do pěti skupin (tradičně hodnocených na úrovni rodů nebo podrodů): *Sorbus*, *Cormus*, *Torminaria*, *Aria* a *Chamaemespilus* (Kovanda, 1961a; Májovský, 1992; Kutzelnigg, 1994; Rich et al. 2010). Tyto skupiny jsou dobře definované, mezi sebou odlišitelné a většinou obsahují primární sexuální druhy (kromě *Aria*). Tento koncept bývá někdy doplněn o šestou skupinu, *Micromeles*, obsahující výhradně asijské druhy (Gabrielian 1978, podle Aldasoro et al. 2004). Na území České republiky se v současné době vyskytují čtyři z pěti základních skupin. Chybějící *Chamaemespilus* má nejbližší zástupce rodu *S. chamaemespilus* (jeřáb mišpulka) na území Karpat a Alp (Warburg and Kárpáti, 1968; Májovský, 1992).

Vedle těchto základních skupin je velké množství hybridogenních taxonů, dále rozdělených podle rodičovské kombinace do jednotlivých agregátů takto (Obr.3):

- *S. latifolia* agg. (*S. aria* agg. × *S. torminalis*)
- *S. hybrida* agg. (*S. aria* agg. × *S. aucuparia*) některými autory označován jako *S. anglica* agg. (Nelson-Jones et al. 2002).
- *S. sudetica* agg. (*S. aria* agg. × *S. chamaemespilus*).



Obr. 3: Schéma vztahů uvnitř rodu *Sorbus*. Základní druhy jsou orámovány modře, hybridogenní agregáty vzniklé jejich křížením zeleně. Speciální postavení má *S. aria* agg., který je vždy rodičovským druhem.

Unikátní postavení v tomto systému má skupina *S. aria* agg., jejíž zástupci jsou vždy jedním z rodičů hybridogenních jedinců (Nelson-Jones et al. 2002).

Toto rozdělení ale neobsahuje všechny popsané a uznávané taxony, jako je například *S. intermedia* stejně jako další trihybridi (např. západokarpatské *S. montisalpe*, *S. pekarovae*, *S. diversicolor* atd.). (Kovanda 1999, Nelson-Jones et al. 2002, Bernátová and Májovský 2003).

Z dalších publikovaných systémů stojí za zmínku ještě rozdělení hybridogenních taxonů podle Májovského a Bernátové (2001), kteří navrhli rozdělení zahrnující i některé trihybridní linie. Názvy těchto podrodů jsou tvořené složeným názvem základních podrodů, jež se účastní jejich vzniku: *Soraria*, *Tormaria*, *Chamaespilaria*, *Chamsoraria*. I z tohoto rozdělení je patrná výlučná pozice skupiny *S. aria* agg., jakožto hlavního hybatele hybridizace v rámci celého rodu *Sorbus*. (Májovský and Bernátová 2001).

2.2 Zdroje variability

2.2.1 Hybridizace

Při mezidruhové hybridizaci dochází ke splynutí gamet dvou různých rodičovských taxonů. Je popisována na různých taxonomických úrovních. Předpoklady usnadňující hybridizaci jsou allogamie, vytrvalost rostlin a schopnost nepohlavního rozmnožování (Ellstrand et al. 1996). Dalším předpokladem pro hybridizaci je existence hybridogenní zóny (Flegr 2009). Ke křížení stejných rodičů může docházet opakovaně. Vzniklé linie stejných kombinací se logicky mohou geneticky i morfologicky lišit (Hegarty and Hiscock 2005).

Introgrese je speciální případ hybridizace, kdy se hybridogenní jedinec kříží zpětně s jedním z rodičovských druhů (Briggs and Walters 2001). Hybridogenní druhy tak mohou ovlivňovat genomy rodičovských populací v jejich geografické blízkosti (Anderson and Stebbins Jr, 1954).

Pro speciaci nově vzniklé linie je nutný vznik bariéry mezi takovou linií a jejími rodičovskými druhy. Tyto bariéry mohou být prezygotické nebo postzygotické. Prezygotické, takové, které zabraňují samotnému oplodnění, jsou ekologické, fenologické a etologické, gametická kompetice a inkompatibilita. Postzygotické snižují životaschopnost a fertilitu zygot hybridu nebo dalších generací (Rieseberg and Carney 1998).

U čeledi Rosaceae je hybridní speciace velmi častým jevem nejen v rámci jednotlivých rodů, ale i mezi rody (Evans and Cambell 2002).

Hybridizace v rámci rodu *Sorbus*

S ohledem na hybridní evoluci má mezi základními sexuálními druhy rodu *Sorbus* speciální postavení *S. aria* agg. Zástupci tohoto agregátu hybridizují s ostatními sexuálními druhy a jsou vždy jedním z rodičů vzniklých hybridních druhů. Ostatní sexuální druhy se spolu nekříží vůbec (Kovanda 1961, 1999; Warburg and Karpáti 1968). Dále je také známe časté křížení uvnitř agregátu *S. aria* (Bílá 2015).

Stranou hybridizace stojí *S. domestica*, který se neúčastní žádného křížení (Kovanda 1961, 1999; Warburg and Karpáti 1968).

Vzniklí kříženci jsou tradičně rozdělováni do dvou skupin (Kovanda 1999). První skupinou jsou F1-primární hybridy. Ti jsou většinou neplodní. Druhou skupinou jsou hybridogenní taxony často taxonomicky hodnocené na úrovni mikrospecie, která je omezená svou lokalitou. Díky apomixii jsou schopni rozmnožování a nebývají moc morfologicky variabilní. Často zůstávají fakultativně sexuální a účastní se další hybridizace (Robertson et al., 2010).

2.2.2 Polyploidizace

Polyploidizace je proces, jehož výsledkem je jedinec, polyploid, s $3\times$ a více znásobenými sadami chromozomů v somatických buňkách (Stebbins 1971). Podle počtu chromozomových sad označujeme polyploidy specifitěji – triploidi, tetraploidi, pentaploidi atd. U rostlin se s tímto jevem setkáváme běžně a je pokládán za jeden z hlavních hybatelů evoluce (Suda 2009). V současnosti se věda domnívá, že všechny krytosemenné rostliny někdy v minulosti prošly polyploidizací, včetně těch, jejichž karyotyp je zjevně diploidní. Jedinou výjimkou je *Amborella trichopoda* z čeledi *Amborellaceae* (Soltis et al. 2009).

Polyploidi se mohou dělit podle svého vzniku. Z genomu jediného rodičovského druhu vznikají autopolyploidi. Jedincům vzniklým kombinací nejméně dvou druhů, tedy za přispění mezidruhového křížení, vznikají allopolyploidi (Briggs and Walters 2001, Hegarty and Hiscock 2008).

Polyploidizace se neomezuje jen na rostliny. Známé a poměrně časté jsou polyploidní ryby nebo obojživelníci. Unikátní je případ polyploidních hlodavců z Argentiny, který vyvrátil názor, že polyploidie u savců je neslučitelná se životem (Gallardo et al. 1999, Chen 2007, Suda 2009).

Rozeznáváme tři příčiny polyploidizace rostlin. V prvním případě zůstávají chromozomy při meióze pouze v jedné dceřiné buňce. Tento stav nazýváme somatická genomová duplikace a bývá způsoben tepelným šokem nebo v experimentálních podmínkách kolchicinem.

Druhým případem je vznik triploidního mostu, tedy vznik triploidního jedince zpětným křížením tetraploidního potomka s diploidním rodičovským druhem. Tito triploidi bývají většinou sterilní, ale mohou výjimečně vytvořit neredukovanou ($3n$) gametu, která po splynutí s redukovanou ($1n$) gametou rodiče může vytvořit stabilního tetraploida.

Třetím a nejčastějším popisovaným procesem vzniku polyploidů je splynutí neredukovaných gamet, které vznikají díky chybějícímu prvnímu redukčnímu děle-

ní při meióze (Ramsey and Schemske 1998, Briggs and Walters 2001, Rieseberg and Willis 2007, Flegr 2009).

Známou významnou vlastností polyploidů je větší velikost buněk, která ale neznamená nutně větší velikost jedince. U polyploidních rostlin se častěji objevuje samoopylení a apomixie. Polyploidní rostliny se častěji vyskytují v extrémnějších podmínkách než jejich rodiče, a díky tomu nově vznikající druhy svým rodičům nekonkurují (Suda 2009, Hanušová 2014). U autopolyploidů může docházet, kvůli možnosti párování více chromozomů, k nerovnoměrnému rozdělení chromozomů do dceřiných buněk. Tyto gamety jsou pak často sterilní (Briggs and Walters 2001).

Častým důsledkem polyploidizace, díky kterému se polyploidní jedinec stane stabilní linií, je přechod od allogamie k autogamii. Dalšími faktory ovlivňujícími ukotvení nového druhu je dlouhý životní cyklus a mnohdy také schopnost vegetativního rozmnožování. K polyploidizaci může docházet opakovaně (Briggs and Walters 2001).

Polyploidizace v rámci rodu *Sorbus*

V evoluci rodu *Sorbus* je polyploidizace velmi častá, a to jak vznik allopolyploidů díky mezidruhovému hybridizaci, tak i autopolyploidizace. Příkladem jsou někteří jedinci *S. latifolia* agg. z Velké Británie a Francie (Bailey et al. 2008).

2.2.3 Apomixie

Apomixie je stav, kdy semeno vzniká bez oplození vajíčka. Známe několik možných způsobů, jak k tomuto jevu může dojít. V prvním možném případě, který se nazývá sporofytická apomixie, vznikne embryo ze somatické buňky vajíčka. Při gametofytické apomixii se naproti tomu ve vajíčku vyvine neredukovaný zárodečný vak. Vznikne-li semeno z neredukované megasporu, hovoří se o diplosporní apomixii; v případě vzniku ze somatické buňky vajíčka se jedná o aposporní apomixii. Další variantou je haploidní partenogeneze. Jedná se o samostatný vývoj embrya z redukované vaječné buňky (Jankun and Kovanda 1986, Krahulcová and Krahulec 2000).

Přechod od pohlavního rozmnožování k apomixii může probíhat několika způsoby, vždy ale ve třech fázích. Nejprve je přerušena meióza a vystřídá ji aposporie nebo diplosporie. Dalším krokem je partenogeneze (vývoj embrya bez oplození) a na závěr vytvoření funkčního endospermu. Obvykle k této změně dochází jen u samičího reprodukčního mechanismu a vznik samčích gamet meiózou není porušen (Grimmelli et al. 2001).

Vznik apomixie neznamena vždy zánik sexuality. Většina rostlin kombinuje více možností rozmnožování, jde tedy o fakultativní apomixii. Díky tomu mohou rostliny reagovat na změny prostředí (Briggs and Walters 2001, Richards 2003). Obligátní apomixie, rozmnožování pouze nepohlavně, je vzácnější (Asker and Jerling 1992, Whitton et al. 2008).

Důsledkem apomixie je zachování výhodného genotypu, což ale vede k extrémnímu snížení variability. Díky kombinaci s hybridizací a polyploidizací je ale negativní vliv recesivních mutací odstraněn (Briggs and Walters 2001, Richards 2003).

Apomixie v rámci rodu *Sorbus*

Variabilita reprodukčních způsobů v rámci rodu *Sorbus* je stejně jako v celé původní podčeleď *Maloideae* velká (Dickinson and Campbell 1991). Známe je sexuální rozmnožování základních druhů, mnoho typů nepohlavního rozmnožování a kombinování v rámci jednoho jedince (Jankun and Kovanda 1986, 1987; Kovanda 1999, Kociánová et al. 2005, Bílá 2015). Nejběžnější je fakultativní apomixie. Konkrétně gametofytická aposporní apomixie s nezbytností oplodnění endospermu (pseudogamií) (Liljefors 1953, 1955).

3 Metodika

3.1 Materiál

Díky navázání spolupráce s Výzkumným ústavem Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví byla pro zpracování této diplomové práce využita unikátní sbírka vybraných druhů střeoevropských zástupců rodu *Sorbus*. Tato sbírka se nachází na několika plochách v Dendrologické zahradě v Průhonicích. Díky pozičním mapám a známému původu roubů a semenáčků není problém s určením druhů a jejich původu. Podrobné informace o původu využitých stromů v Příloze 1.

Z dostupné sbírky byly vybrány přednostně starší stromy s potenciálem tvorby většího množství květenství. Z každé skupiny druhů byli vybráni zástupci různých ploidních úrovní. Více o vybraných druzích v tabulce 1.

druh	ploidie	agg.	rodičovská kombinace
<i>S. xdeciens</i>	2x	L	<i>S. aria</i> agg. × <i>S. torminalis</i>
<i>S. arias.str.</i>	2x	A	základní druh
<i>S. aucuparia</i>	2x	AU	základní druh
<i>S. bohémica</i>	3x	H	<i>S. aria</i> agg. × <i>S. aucuparia</i>
<i>S. cucullifera</i>	3x	A	kříženec <i>S. aria</i> agg.
<i>S. danubialis</i>	4x	A	kříženec <i>S. aria</i> agg.
<i>S. eximia</i>	3x	L	<i>S. aria</i> agg. × <i>S. torminalis</i>
<i>S. gemella</i>	3x	L	<i>S. aria</i> agg. × <i>S. torminalis</i>
<i>S. hybrida</i>	4x	H	<i>S. aria</i> agg. × <i>S. aucuparia</i>
<i>S. margittaiana</i>	4x	NA	<i>S. austriaca</i> (<i>S. aria</i> agg. × <i>S. aucuparia</i>) × <i>S. chamaemespilus</i>
<i>S. pauca</i>	4x	H	<i>S. aria</i> agg. × <i>S. aucuparia</i>
<i>S. sudeticas. str.</i>	4x	S	<i>S. aria</i> agg. × <i>S. chamaemespilus</i>
<i>S. torminalis</i>	2x	T	základní druh

Tab. 1: Přehled druhů vybraných pro experimentální hybridizaci. Vedle názvu druhů je zde uvedena ploidní úroveň a rodičovská kombinace (nebo příslušnost k základním druhům).

3.1.1 Sběr listů pro mikrosatelitovou analýzu

Pro molekulární potvrzení původu stromů a potvrzení správnosti určení druhů byla udělána mikrosatelitová analýza. Pro tento účel bylo z každého stromu používaného k experimentální hybridizaci odebráno pár listů, na jaře roku 2016. Do podzimu roku 2017, kdy byla provedena izolace DNA, byly listy uloženy v silikagelu.

3.1.2 Výběr hybridizací

Vzhledem k množství možných kombinací na jedné straně a dostupnosti květenství a lidské síly na straně druhé bylo nutné učinit výběr. Pro experimentální křížení byly přednostně vybírány pouze zástupci jednotlivých agregátů s různou ploidní úrovní (tj. heteroploidní hybridizace). Konkrétní květenství byla vybírána náhodně s ohledem na jejich přístupnost, tzn. většina byla umístěna vně koruny stromů do výšky cca 2 metrů.

3.2 Experimentální hybridizace

V prostorách Dendrologické zahrady v Průhonicích je na čtyřech plochách umístěna sbírka stromů rodu *Sorbus*. Převážně se jedná o druhy střední Evropy, jejichž původ je známý. Pro účely experimentu bylo vybráno 15 druhů zastoupených dohromady 30 jedinci (viz Příloha 1). Experimentální křížení vybraných druhů probíhalo celkově tři sezóny v letech 2014-2017. První rok proběhla pilotní studie v rámci diplomové práce Jany Bílé (2015). Největší počet semen byl odebrán v sezóně 2016. Rok 2017 byl poznamenán suchým obdobím, během kterého většina květenství zaschla a nevytvořila plody.

Bylo vybráno 102 kombinací (viz Příloha 2) tak, aby došlo ke křížení mezi všemi základními druhy a agregáty druhů hybridních v obou směrech (matka->otec; otec ->



Obr. 4: Zakryté květenství na jedinci použitém v hybridizačním experimentu. Kombinace pro křížení byla vybírána s ohledem na dostupnost zástupců jednotlivých agregátů a skupin, jejich ploidii a dalších kritérií. Konkrétní květenství byla vybírána náhodně s ohledem na jejich přístupnost.

matka), byly zastoupeny všechny známé a dostupné ploidní úrovně a proběhly kontroly. Kromě křížení s dalšími druhy rodu *Sorbus* byl zjišťován vliv mentor efektu pomocí křížení se zástupcem příbuzného rodu *Malus*. Konkrétně byl vybrán druh *Malus sargentii* s ohledem na odlišnou velikost genomu (2,918 pg; Höfer and Meister 2010). Dále byla jako kontrola použita dvě nezakrytá květenství (pozitivní) a jedno zakryté (negativní), u nichž byl na jaře spočítán počet květů a na podzim počet plodů k ověření úspěšnosti sezóny.

Každou sezónu byla na jaře před rozkvětem potřebná květenství zakryta dvojitým pytlíkem (z monofilu). V době kvetení všech druhů byla vždy květenství zastupující otcovské jedince odstřižnuta a přenesena k mateřským rostlinám. Obě květenství byla odkryta, proběhl přenos pylu kontaktní metodikou (tj. přímým kontaktem) a mateřské květenství bylo opět zakryto. V některých případech bylo otcovské květenství ponecháno v pytlíku. Bylo tomu tak v případech neúplného rozvití květů mateřské nebo otcovské rostliny. Při tomto kroku byl počítán počet květů v použitých květenstvích i v kontrolních.

Na podzim byla vzniklá plodenství z mateřských rostlin odstřižnuta. Byl spočítán počet plodů každého plodenství (i kontrolních) a později také počet semen.



Obr. 5: Podzimní sklizeň plodenství. Na podzim každé sezóny docházelo ke sklizni zakrytých plodenství. Byla vždy odstřižnuta celá. Při sklizni byl zjišťován také počet plodů kontrolních nezakrytých květenství, případně obecně celková plodnost jedinců.

3.3 Analýza semen metodou průtokové cytometrie (FCSS: Flow Cytometric Seed Screen)

Hlavní metodou této diplomové práce byla analýza semen vzniklých experimentální hybridizací. Byla získána informace o ploidii embrya a endospermu a na základě jejich poměru bylo odvozeno, jakým reprodukčním způsobem vzniklo semeno. (Matzk et al. 2000; Dobeš and Paule 2010; Krahulcová and Rotreklová 2010)

Každé plodenství bylo označeno číslem, každý jednotlivý plod písmenem a každé analyzované semeno číslem. Pomocí separační jehly a pinzety byla z jednotlivých plodů vypreparována semena. Pomocí žiletky byla odříznuta část semene a dále se postupovalo podle standardní metodiky, s drobnými úpravami dle Jany Bílé, která ji pro účely analýzy semen rodu *Sorbus* optimalizovala (Bílá 2015).

Analýza semen byla uskutečněna v laboratoři průtokové cytometrie PřF UK standardním postupem s drobnými úpravami, blíže specifikovanými níže (Doležel et al. 2007). Bylo použito fluorescenční barvivo DAPI a jako standard *Bellis perennis* a *Carex acutiformis*. Část semene spolu s cca 1 cm² standardu byla rozsekána žiletkou v 650 ml vychlazeného pufru Otto I (650 ml, složeno z 0,1 M kyseliny citronové a 0,5% Tween 20) na Petriho misce. Vzniklá směs byla filtrována přes nylonový filtr s průměrem ok 42 µm (Silk & Progress, s. r. o., Brněnec, Česká republika). Výsledné vzorky se nechaly inkubovat přibližně půl hodiny. Pokud vznikla okem viditelná usazenina, byly znovu přefiltrovány. Dále byl přidán 1 ml barvicího roztoku (fluorescenční barvivo DAPI; pufr Otto II; antioxidantu β-merkaptoethanolu). Po působení 2 minut barviva byl vzorek analyzován na průtokovém cytometru CyFlow ML (UV LED 365 nm jako excitační zdroj).

3.3.1 Vyhodnocení analýz

Výstupem průtokového cytometru jsou histogramy ukazující počty jader a relativní intenzitu fluorescence. Úspěšnost každé analýzy byla zhruba hodnocena hned po jejím průběhu. Pokud nebyl histogram čistý, nebo chyběl nějaký peak, proběhla druhá analýza z nového vzorku jiné části semene. Histogramy úspěšných nebo alespoň částečně úspěšných analýz byly vyhodnocovány v programu Partec FloMax 2.0. Byly zaznamenány pozice peaků standardu a vzorku a dále variační koeficient (CV), které vypovídají

o kvalitě analýzy. Z poměru peaků embrya a endospermu byl vyvozen možný reprodukční způsob (Matzk et al. 2000; Dobeš and Paule 2010; Krahulcová and Rotreklová 2010).

3.4 Mikrosatelity – Molekulární analýza

Za účelem ověření původu a druhové příslušnosti používaných stromů se sbírky byla prováděna molekulární analýza mikrosatelitovými markery. Jejich výběr a řazení do multiplexů vycházelo ze zkušenosti z dřívějších studií rodů *Sorbus* a *Malus* (Gianfranceschi et al. 1998; Oddou-muratorio et al. 2001; Nelson-Johnes et al. 2002; Vít 2006; Lepší et al. 2008, 2009; Gonzalez-Gonzalez et al. 2010; Bílá 2015). Po této rešerši bylo vybráno 9 primerů: Mss13, Ms6g, SA03, SA06, SA08, SA191, Mss5, Mss6, D11. Vzhledem k druhové rozmanitosti testovaných vzorků byly všechny primery testovány zvlášť na vybraných vzorcích. Šlo vždy o zástupce všech větších skupin druhů. Po těchto testech byl vyřazen primer SA06 z důvodu nečitelnosti výsledků. Dále pak byly testovány i sestavené multiplexy (viz Tab. 2). Dále proběhlo testování namíchaných multiplexů a to na jedincích: 400, 401, 402, 410, 416, 417, 420, 421, 423, 426, 427, SCH1, SCH2, ST35, Z. Z důvodů špatné amplifikace Mss6 v multiplexu byl tento úsek vyřazen z dalšího testování.

primer	testování jedinci
Multiplex 1	
SA03	400, 401, 421, 423, 426, SCH1, SCH2
Mss13	400, 401, 421, 426, SCH1, SCH2, ST35
Ms6g	400, 401, 402, 410, 421, 423, 426, SCH1, SCH2
Multiplex 2	
SA191	400, 401, 421, 423, 426, SCH1, SCH2
D11	400, 401, 402, 410, 421, 423, 426, SCH1
Mss5	400, 401, 402, 410, 421, 423, 426, SCH1, SCH2
SA08	400, 401, 402, 410, 421, 423, 426, SCH1, SCH2
vyřazené	
SA06	400, 401, 421, 423, 426
Mss6	400, 401, 421, 423, 426, SCH1, SCH2, ST35

Tab. 2: Přehledová tabulka uskutečněných testů jednotlivých primerů. Před namícháním multiplexů byly všechny primery otestovány na zástupcích všech větších skupin druhů. Číselné označení použitých jedinců je v Příloze 3. Po testech jednotlivých primerů byl vyřazen SA06 z důvodu nečitelnosti výsledků. Dále pak po testech multiplexů MSS6 z důvodů špatné amplifikace.

3.4.1 Izolace DNA

Z listů použitých stromů byla izolována celková DNA pro ověření jejich původu a správnému určení ze zdrojů Dendrologické zahrady v Průhonicích. Byla použita metoda CTAB (Pfosser et al., 2006) dále optimalizovaná pro rod *Sorbus* (Vít 2006; Lepší et al. 2008, 2009; Bílá 2015) s dalšími drobnými změnami specifikovanými dále.

Byly použity mladší listy vysušené v silikagelu (Silicarbon). Části čepele velké přibližně 2cm² byly rozdrceny v eppendorfkách 2 wolfram-karbidovými kuličkami na mlýnku Mixer Mill 400 (Retsch) při frekvenci 27 otáček/sekunda po dobu 3 minut. Do rozdrceného materiálu bylo přidáno 700 µl roztoku CTAB (cetyltrimetylamonium bromidu) s 2% merkaptoethanolem, špetkou PVP-K30 polyvinylpyrolidon; Roth) a 5 µl RNasy A (10 µg/ml, Thermo Scientific. Výsledná směs byla inkubována 30 minut na termomixeru (Eppendorf Thermomixer Comfort) při 60 °C a 1400 rpm. Následně bylo přidáno 500 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1). Zkumavky byly 3x převráceny a nechaly se odstát 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byla směs centrifugována 6 minut při 13200rpm. Supernatant byl přepipetován a bylo k němu přidáno 500 µl leďového isopropanolu. Po 2x převrácení byly zkumavky nechány 30 minut odstát v -20°C. Následovalo centrifugování 3 minuty při 13200 rpm. Supernatant byl poté slit do kádinky a eppendorfky s peletem DNA byly nechány vyschnout. Poté bylo přidáno 400 ml vychlazeného 96% ethanolu a vzorky byly inkubovány 15 minut na termobloku při 37°C a 1200rpm. Následovalo 5 minut centrifugování při 13200 rpm. Po slití supernatantu bylo přidáno 200 µl vychlazeného 70% ethanolu. Vzorky se nechaly odstát 5 minut při laboratorní teplotě a byly centrifugovány při 13200 rpm. Opět byl slit supernatant a pelety DNA byly vysušeny v otevřených eppendorfkách na termobloku při 65°C po dobu 6 minut. Vysušený pelet DNA byl rozpuštěn ve 150 µl TE pufru.

Koncentrace DNA vzorků (Příloha 3) byla změřena na přístroji Nanodrop (Thermo Scientific) a vzorky byly naředěny na koncentraci 10 ng/ µl pro PCR reakci.

3.4.2 Multiplexová PCR

Po testování jednotlivých primerů byly sestaveny a otestovány dva multiplexy (výsledné rozdělení a další informace viz Tab. 3), oba použité pro všechny vzorky.

Všechny reakce probíhaly ve výsledné směsi 12 µl. Přesné složení se lišilo v závislosti na míře amplifikace daného úseku (viz Tab. 4)

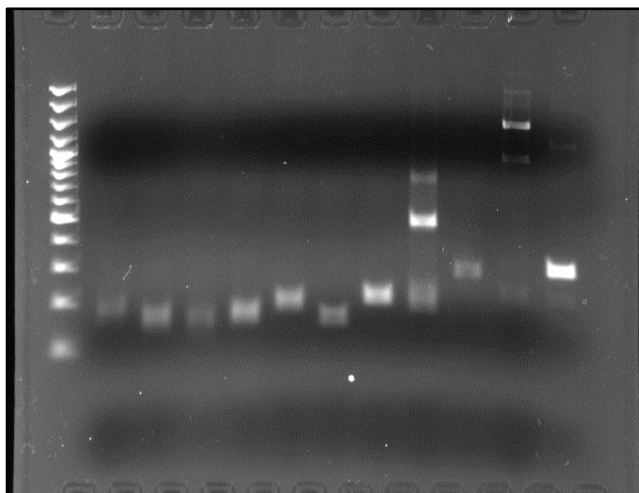
Lokus	Sekvence primeru R / F	Délka fragmentu (bp)	typ rep. sekvence	barva	Citace
Multiplex 1					
MSS13	TATGCGTCTTTCCATTCCG	210-268	CA	modrá	Oddou-muratorio et al. 2001
	GCGTTTGACTCACTCAGATTTG				
Ms6g	CGGAGGGTGCTGCCGAA	152-176	?	zelená	Nelson-Johnes et al. 2002
	GCCCAGCCCATATCTGCT				
SA03	CACTTCTTCCTGCTGTTTGG	212-250	GA	zelená	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	ACTACTGCTACTTCTGTGGG				
Multiplex 2					
D11	AGCGTCCAGAGCAACAGC	108-200	AG	žlutá	Gianfranceschi et al. 1998
	AACAAAAGCAGATCCGTTGC				
SA191	AAGTTTACAAGAGTGTGTTCA	211-258	GA	modrá	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	GAATTCATGAAAGCAGCTAATG				
Mss5	CCCCAACAAACATTTTCTCC	112-148	GA	zelená	Oddou-muratorio et al. 2001
	CCTCTCGCTCTTGCCTCT				
SA08	CAGAGAGAGTGCCTGCCT	234-278	CT	zelená	Gonzalez-Gonzalez et al. 2010
	GAATCTTGGCAGTTGCCT				

Tab. 3: Bližší specifikace primerů používaných při mikrosatelitové analýze a jejich rozdělení do výsledných multiplexů. Důležitými údaji je délka fragmentů a barva.

Multiplex 1		Multiplex 2	
Qiagen M.mix	6 µl	Qiagen M.mix	6 µl
primer R (25 ng/µl)	3×0,1 µl	primer R (25 ng/µl)	3×0,1 µl + 1×0,07 µl
primer F (25 ng/µl)	3×0,1 µl	primer F (25 ng/µl)	3×0,1 µl + 1×0,07 µl
ddH ₂ O	4,4 µl	ddH ₂ O	4,26 µl
DNA (10 ng/µl)	1 µl	DNA (10 ng/µl)	1 µl
celkem	12 µl	celkem	12 µl

Tab. 4: Přesné složení multiplexových mixů. Podrobné složení PCR směsí obou multiplexových reakcí pro 1 vzorek. Multiplex 2 obsahoval pouze 0,07 µl R i F primerů úseku D11.

Déle probíhala kontrola úspěšnosti amplifikace po každém běhu termocykléru pomocí elektroforézy na pár vybraných vzorcích. Byl použit 1,8% agarosový gel s puforem TBE, na který byly naneseny 4 μ l vzorku s 1 μ l loading dye (Thermoscientific). Byl použit



1,5 μ l žebříček O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, ready-to-use (Thermoscientific). Gely byly foceny pomocí systému Kodak Gel Logic 100 (Obr.6.)

Obr. 6: Kontrola amplifikace na gelu. Vzorky pro kontrolu byly vybírány většinou z okrajů jednotlivých stripů a byly nanášeny na 1,8% agarosový gel. Na první pozici je standard O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus.

3.4.3 Příprava na fragmentační analýzu

Po ověření úspěšnosti PCR se vzorky dále připravily na fragmentační analýzu. Ta byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK na šesnáctikapilárovém analyzátoru 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Byla namíchána směs deionizovaného formamidu (9,75 μ l na jeden vzorek) a GeneScan-ROX 500 size standard (20:1, Applied Biosystems; 0,25 μ l na jeden vzorek). 10 μ l výsledné směsi bylo smícháno s 1 μ l vzorku, PCR produktu. Dále proběhla 3 minuty denaturace na termocykléru při 95°C.

3.4.4 Vyhodnocení dat

Získaná data ve formátu *.fsa byla zpracována v programu GeneMarker (ver. 2.6.0, SoftGenetics). Alely byly skórovány manuálně. Byly zaznamenány délky fragmentů pro každý vzorek a dále porovnávána jejich přítomnost či absence v programu Excel. Pro ověření některých výsledků bylo pracováno i se studií Jany Bílé (2015).

4 Výsledky

4.1 Stručně

4.1.1 Mikrosatelity

Pro ověření původu používaných jedinců byla provedena analýza mikrosatelitů. Bylo třeba metodu optimalizovat pro náš výběr druhů, proto proběhla řada testů. Po těchto testech byly dva primery vyřazeny a ze zbylých sedmi byly vytvořeny konečné dva multiplexy. Z čepelí listů námi používaných stromů byla izolovaná DNA a proběhla analýza.

Naše výsledky potvrdily příslušnost jedinců k dříve určeným jednotlivým druhům. Jedinou výjimkou byl jedinec z lokality Zítovka v Průhonickém parku, který jsme chybně považovali za *S. collina*. Jeho původ a příslušnost k nějakému jinému druhu je neznámý. Výsledky tohoto jedince neodpovídali žádnému jinému vzorku našeho testu.

4.1.2 Experimentální křížení a FCSS

Hlavním metodickým přístupem přinášejícím většinu výsledků byla experimentální hybridizace a následná analýza vzniklých semen metodou průtokové cytometrie (FCSS – flow cytometric seed screen). Probíhala v letech 2014 – 2017 a bylo provedeno více než 100 kombinací. Úspěšnost sezóny 2017 byla poznamenána nepříznivými klimatickými podmínkami. Pro hlavní výsledky byl dataset protříděn a byla vybrány jen ty analýzy semen u nichž bylo možné detekovat embryo i endosperm a na jejich základě odvodit reprodukční způsob. Dalšími vyřazenými analýzami se staly ty z homoploidních křížení, u nichž nešlo určit příspěvek rodičů z pouhého poměru. Po mikrosatelitových analýzách byly vyřazeny ještě kombinace se špatně určeným jedincem z lokality Zítovka. V tomto finálním výběru je 606 analýz. Pro přehlednost byly tyto výsledky rozděleny do čtyř základních skupin. Nejméně častá byla autogamie (cca 6% případů), tedy sexuální rozmnožování s použitím pouze vlastního pylu. Dalším typem bylo sexuální rozmnožování s použitím námi dodaného otcovského pylu, dále označované jako hybridizace. Nejhojnějším typem byla standardní pseudogamie, s využitím otce pro oplození endospermu. Pro poslední typ byl vytvořen pracovní název

„autonomní pseudogamie“. Jednalo se o případy pseudogamie, kdy jedinec nevyužil námi dodaný pyl a jako donora samčích gamet pro vznik endospermu využil pyl vlastní.

Dále byly hodnoceny výsledky několika typů kontrolních křížení. Šlo o nezakrytá květenství, která ověřovala plodnost používaných stromů. Druhým typem byly samooppylení květenství, pro ověření selfinkompatibility. Posledním bylo křížení s *Malus sargentii*, které mělo přinést informaci o případném Mentor efektu. Ten se ukázal u *S. hybrida*.

4.2 Mikrosatelity

Pro analýzu mikrosatelitů bylo třeba izolovat DNA materiál z našich testovaných jedinců. Pro tuto izolaci byly zvoleny čepele jarních listů. Výtěžnost byla velmi dobrá. Naměřené koncentrace jsou uvedeny v Příloze 3. Pro další práci byly vzorky naředěny na jednotnou koncentraci 10 ng/μl.

Přesto, že tato metoda byla v minulosti používána pro zástupce rodu *Sorbus*, bylo třeba vybrat správné primery a optimalizovat složení multiplexů pro námi vybrané zástupce druhů. Proběhla proto řada testů. Nejdříve byly vybrané primery testovány se zástupci jednotlivých agregátů zvlášť, viz Tabulka 2 v kapitole Metodika. Po tomto testování byl vyřazen primer SA06, jehož výsledky bylo velmi obtížné vůbec nějak interpretovat. Následovalo testování vybraných druhů v multiplexech. Tento test z dalších analýz vyřadil primer Mss6, který se v multiplexové kombinaci příliš neamplifikoval, a nepřinášel tím pádem téměř žádné výsledky.

Výsledky byly hodnoceny manuálně a délky fragmentů každého vzorku zaznamenávány do tabulky v programu Excel. Dále byla jejich přítomnost a velikost porovnávána pomocí filtrů. Bohužel množství dat neumožnilo hlubší analýzy. U některých druhů proběhlo také porovnání s výsledky analýz Jany Bílé (2015, ústní sdělení). Po tomto zhodnocení bylo možné konstatovat, že všichni jedinci odpovídají svému dřívějšímu určení a byly znatelné jejich příbuzenské vztahy. Jediný problém se ukázal u vzorku Z, chybně určeném jako *S. collina* z lokality Zítovka v Průhonickém parku. Výsledky analýz tohoto jedince neodpovídali žádným jiným výsledkům, které byly k dispozici, proto byl tento jedinec vyřazen.

4.3 Reprodukční způsoby

4.3.1 Experimentální křížení

Výsledky experimentálního křížení byly získávány a kvantifikovány na několika úrovních. Od roku 2016 byl při opylování zaznamenáván počet květů mateřských květenství. Na podzim každé sezóny byla vytvořená plodenství odštířena a v laboratoři vybalena z látkových pytlíčků a byl spočítán a zaznamenán počet plodů. Do analýzy semen byla celá plodenství skladována v lednici. Skladování v lednici umožnilo zpracovávání semen postupně v řádu několika měsíců. Další kvantitativní výsledky byly získávány při zpracování plodů a získávání semen k analýze, jelikož byl zaznamenáván jejich počet (také až od roku 2016). Poslední úrovní bylo vyhodnocování uskutečněných analýz. Některá semena i přes svůj dobrý vzhled neposkytovala vyhodnotitelné výsledky. Hlavním důvodem je zřejmě velké množství sekundárních metabolitů, které analýzy narušovaly. Přehled těchto dat je v tabulce 5 dále.

rok	matka	agg. mat-ky	pl. m.	Otec	agg. otce	pl. o.	počet květů	počet plodů	počet semen	emb i end	jen emb
2014	<i>aria</i>	A	2	<i>bohemika</i>	L	4	NA	NA	0	0	0
2014	<i>danubialis</i>	A	4	<i>aria</i>	A	2	NA	NA	0	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>aucuparia</i>	AU	2	30	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>aucuparia</i>	AU	2	35	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>aucuparia</i>	AU	2	36	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>danubialis</i>	A	4	38	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>danubialis</i>	A	4	40	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>bohemika</i>	L	3	40	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>eximia</i>	L	3	42	0	0	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>xdecipiens</i>	L	2	45	0	0	0	0
2016	<i>xdecipiens</i>	L	2	<i>aria</i>	A	2	45	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>bohemika</i>	L	3	49	0	0	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>aucuparia</i>	AU	2	50	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>aria</i>	A	2	52	0	0	0	0
2016	<i>xdecipiens</i>	L	2	<i>aria</i>	A	2	54	0	0	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>bohemika</i>	L	3	55	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>xdecipiens</i>	L	2	56	0	0	0	0
2016	<i>aucuparia</i>	AU	2	<i>torminalis</i>	T	2	60	NA	NA	NA	NA
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>cuculifera</i>	A	3	60	0	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>aria</i>	A	2	70	0	0	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>hybrida</i>	H	4	75	0	0	0	0

rok	matka	agg. mat- ky	pl. m.	Otec	agg. otce	pl. o.	po- čet květů	počet plo- dů	počet se- men	em b i end	jen em b
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>eximia</i>	L	3	80	0	0	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>sudetica</i>	S	4	100	0	0	0	0
2016	<i>gemella</i>	L	3	<i>gemella</i>	L	3	150	0	0	0	0
2016	<i>aucuparia</i>	AU	2	<i>torminalis</i>	T	2	170	NA	NA	NA	NA
2016	<i>aucuparia</i>	AU	2	<i>danubialis</i>	A	4	190	0	0	0	0
2016	<i>×decipiens</i>	L	2	<i>torminalis</i>	T	2	70	1	0	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>bohemica</i>	L	3	45	2	0	0	0
2017	<i>cuculifera</i>	A	3	<i>torminalis</i>	T	2	40	3	0	0	0
2016	<i>aucuparia</i>	AU	2	<i>pauca</i>	H	4	120	4	0	0	0
2017	<i>bohemica</i>	L	3	<i>torminalis</i>	T	2	50	6	0	0	0
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>×decipiens</i>	L	2	25	9	0	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>cuculifera</i>	A	3	55	1	1	0	0
2016	<i>eximia</i>	L	3	<i>eximia</i>	L	3	95	4	1	0	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>torminalis</i>	T	2	145	9	1	0	0
2014	<i>hybrida</i>	H	4	<i>aria</i>	A	2	NA	NA	1	0	0
2014	<i>hardegen- sis</i>	L	2	<i>cuculifera</i>	A	3	NA	NA	1	1	0
2014	<i>bohemica</i>	L	3	<i>danubialis</i>	A	4	NA	NA	2	1	0
2016	<i>×decipiens</i>	L	2	<i>aria</i>	A	2	32	2	2	2	0
2016	<i>pauca</i>	H	4	<i>aria</i>	A	2	70	6	8	3	0
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>×decipiens</i>	L	2	45	4	6	4	0
2016	<i>bohemica</i>	L	3	<i>torminalis</i>	T	2	80	20	9	8	0
2015	<i>aria</i>	A	2	<i>danubialis</i>	A	4	NA	NA	NA	8	0
2015	<i>danubialis</i>	A	4	<i>bohemica</i>	L	3	NA	NA	NA	9	0
2016	<i>aucuparia</i>	AU	2	<i>aria</i>	A	2	420	31	15	15	0
2017	<i>aucuparia</i>	AU	2	<i>hybrida</i>	H	4	270	23	18	18	0
2014	<i>cuculifera</i>	A	3	<i>aria</i>	A	2	NA	NA	20	20	0
2015	<i>gemella</i>	L	3	<i>danubialis</i>	A	4	NA	NA	NA	29	0
2015	<i>bohemica</i>	L	3	<i>danubialis</i>	A	4	NA	NA	NA	31	0
2015	<i>cuculifera</i>	A	3	<i>danubialis</i>	A	4	NA	NA	NA	38	0
2015	<i>gemella</i>	L	3	<i>aria</i>	A	2	NA	NA	NA	79	0
2015	<i>cuculifera</i>	A	3	<i>aria</i>	A	2	NA	NA	NA	99	0
2016	<i>sudetica</i>	S	4	<i>aria</i>	A	2	37	4	9	4	1
2016	<i>bohemica</i>	L	3	<i>aria</i>	A	2	45	15	21	16	1
2016	<i>bohemica</i>	L	3	<i>torminalis</i>	T	2	100	23	26	16	1
2016	<i>hybrida</i>	H	4	<i>aucuparia</i>	AU	2	150	19	21	18	1
2016	<i>bohemica</i>	L	3	<i>aria</i>	A	2	75	21	27	25	1
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>sudetica</i>	S	4	130	3	4	2	2
2016	<i>hybrida</i>	H	4	<i>aucuparia</i>	AU	2	130	20	22	15	3
2016	<i>danubialis</i>	A	4	<i>aria</i>	A	2	72	13	22	13	4

rok	matka	agg. matky	pl. m.	Otec	agg. otce	pl. o.	počet květů	počet plodů	počet semen	emb i end	jen emb
2016	<i>gemella</i>	L	3	<i>torminalis</i>	T	2	185	45	30	16	4
2016	<i>eximia</i>	L	3	<i>Aria</i>	A	2	120	24	26	11	7
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>xdecipiens</i>	L	2	67	21	27	11	7
2016	<i>danubialis</i>	A	4	<i>torminalis</i>	T	2	113	17	33	12	8
2016	<i>danubialis</i>	A	4	<i>cuculifera</i>	A	3	85	19	31	17	15
2016	<i>sudetica</i>	S	4	<i>aria</i>	A	2	67	18	36	6	16
2016	<i>aucuparia</i>	AU	2	<i>hybrida</i>	H	4	300	100	55	1	20
2016	<i>danubialis</i>	A	4	<i>aucuparia</i>	AU	2	135	31	53	24	26

Tab. 5: Přehled kvantitativních dat zaznamenaných na všech úrovních experimentálního křížení a následné analýzy semen. Kromě názvu druhů je uvedena jejich ploidie (pl.m./pl.o.) a označení agregátů (agg. matky/agg. otce)- A – *S. aria* agg., L – *S. latifolia* agg., H – *S. hybrida* agg., S – *S. sudetica* agg., AU – *S. aucuparia*, T – *S. torminalis*; Pokud je uvedeno NA – data nebyla k dispozici. Pro každý parametr je použita samostatně barevná škála od červené (pro 0 hodnoty) po zelenou (nejvyšší hodnoty). Zaznamenaný jsou počty květů, plodů, semen a analýz s detekovaným embryem i endospermem nebo pouze embryem. Seznam je řazen dle úspěšnosti křížení. Kromě druhů účastných v křížení je uvedeno jejich zařazení do agregátů a ploidie.

4.3.1.1 Negativní výsledky

Samostatným tématem zpracování výsledků je práce s negativními výsledky na všech hodnocených úrovních. V každém jednotlivém případě je třeba odlišit, zda je negativní výsledek relevantním závěrem, nebo je způsoben chybou procesu. Negativní výsledky byly získány v několika krocích. Pokud byla květenství na jaře zakryta, opylena a opět zakryta, výsledky bylo možné sbírat na podzim. Při vybalování plodů z látkových pytlíčků se ukázalo, které kombinace nevyprodukovali žádné plody. Takových případů bylo 26 (viz Tab. 5 výše). Další negativní výsledky se ukázaly při zpracování plodů, kdy některé plody neobsahovaly analyzovatelná semena. Takových kombinací bylo 9 (viz Tab. 5 výše). Výsledkem analýzy semen nemusí být jen úspěšné zaznamenání embrya i endospermu, ale někdy také pouze embrya anebo nelze detekovat vůbec nic, případně obtížně odlišitelné peaky kontaminací, znemožňující rozoznat embryo a endosperm.

V případech, kdy nebyly vytvořeny žádné plody, můžeme uvažovat nad několika příčinami. První (relevantní zejména v případech, kdy byla matkou *S. ×decipiens*) je napadení škůdci. U obou používaných stromů byl ve všech letech zaznamenán výskyt škůdců již v době před rozkvetem. Napadení plodů nebylo příliš časté, jistě méně časté než v přírodě, a to zřejmě díky zakrytí látkovými pytlíčky a tím pádem horší přístupností (Bílá 2015). Dalším důvodem nevytvoření plodů byla jistě mírně odlišná doba kvetení některých druhů. Zvláště opět *S. ×decipiens* kvetla vždy o něco dříve. Posledním z důvodů je skutečnost, že daná kombinace druhů spolu vůbec neinteraguje. A to ať už jde o hybridizaci, pseudogamii nebo potřebu cizího pylu coby stimulu pro samoopylení – Mentor efekt.

4.3.1.2 Vyřazené kombinace

Pro závěrečný dataset analýz semen byla provedeno několik průběžných vyřazení. Samostatně byla zpracovávána data semen kontrolních kombinací a to, jak samoopylených, tak kombinací s *Malus sargentii*. Z důvodu obtížné interpretace byla po sezóně 2015 vyřazena většina homoploidních kombinací a dále již křížení tohoto typu nebyla prováděna. Zachovány byly pouze kombinace diploidních druhů, konkrétně *S.aria* × *S.decipiens*, *S.aucuparia* × *S.aria* u nichž je známá znatelná odlišnost ve velikosti genomu a proto lze přesné výsledky interpretovat a odvodit příspěvek matky a otce při

tvorbě embrya i endospermu. Dále byly vyřazeny nekompletní analýzy, kdy bylo detekováno pouze embryo. Posledním vyřazením bylo odstranění kombinací s chybně určenou *S.collina*. Celkový výsledný dataset pozitivních kompletních analýz semen tedy tvoří 606 analýz.

rok	matka	agg. matky	pl. m.	otec	agg. otce	pl. o.	důvod vyřazení
2015	<i>danubialis</i>	A	4	<i>hybrida</i>	H	4	homoploidní křížení
2015	<i>danubialis</i>	A	4	<i>margittaiana</i>	MA	4	homoploidní křížení
2015	<i>danubialis</i>	A	4	<i>sudetica</i>	S	4	homoploidní křížení
2015	<i>hybrida</i>	H	4	<i>danubialis</i>	A	4	homoploidní křížení
2016	<i>margittaiana</i>	MA	4	<i>danubialis</i>	A	4	homoploidní křížení
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>collina?</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>aria</i>	A	2	<i>collina?</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>aucuparia</i>	AU	2	<i>collina?</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>collina?</i>	A	4	<i>aria</i>	A	2	nejasný taxon
2016	<i>collina?</i>	A	4	<i>torminalis</i>	T	2	nejasný taxon
2016	<i>collina?</i>	A	4	<i>torminalis</i>	T	2	nejasný taxon
2016	<i>collina?</i>	A	4	<i>bohemica</i>	L	3	nejasný taxon
2016	<i>collina?</i>	A	4	<i>bohemica</i>	L	3	nejasný taxon
2016	<i>collina?</i>	A	4	<i>danubialis</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>collina?</i>	A	4	<i>collina??</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>collina?</i>	A	4	<i>collina?</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>danubialis</i>	A	4	<i>collina?</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>gemella</i>	L	3	<i>collina?</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>collina?</i>	A	4	nejasný taxon
2016	<i>torminalis</i>	T	2	<i>collina?</i>	A	4	nejasný taxon

Tab. 6: Přehled vyřazených kombinací z výsledného datasetu. Jednalo se o případy homoploidních křížení převážně ze sezóny 2015, později již nebyly takové kombinace opylovány. Dalším případem byly kombinace prováděné s jedincem chybně určeným jako *S.collina* – nejasný taxon.

4.3.1.3 Kontroly

Z důvodu kontroly úspěšnosti sezóny - samovolné plodnosti mateřských jedinců, byl v roce 2016 do experimentu přidán systém tzv. nezakrytých kontrol. Předchozí roky (2014, 2015) tedy tato data neexistují. Na základě našich záznamů a pozorování můžeme ale říci, že plodnost v těchto letech byla obvyklá. Rok 2017 byl z klimatických důvodů (pozdní jarní mrazy, velmi suché léto) celkově neúspěšný, a proto negativní výsledky z této sezóny nemá smysl dále uvádět. Kvantifikované výsledky sezóny 2016 jsou v Tabulce 7. Je tedy jasné, že všechny mateřské stromy plody tvořily.

druh	počet květů	počet plodů	poměr plody/květy
<i>alnifrons</i>	90	32	36%
<i>aria</i>	125	34	27%
<i>hybrida</i>	225	61	27%
<i>bohemica</i>	99	23	23%
<i>danubialis</i>	90	18	20%
<i>torminalis</i>	76	12	16%
<i>gemella</i>	165	25	15%
<i>eximia</i>	175	24	14%
<i>aucuparia</i>	375	26	7%
<i>×decipiens</i>	144	NA	NA
<i>cuculifera</i>	111	NA	NA
<i>margittaiana</i>	75	NA	NA
<i>sudetica</i>	61	NA	NA

Tab. 7: Počty květů a plodů kontrolních nezakrytých květenství a procentuální vyjádření množství vytvořených semen ku počtu květů. Jedná se o součet dvou květenství. Tyto kontroly byly prováděny v roce 2016 (a 2017) za účelem zjištění plodnosti jedinců používaných v experimentu. V případě *S. aucuparia*, *S. danubialis* a *S. gemella* jsou počty plodů jen z jednoho květenství. Plody u *S. cuculifera*, *S. margittaiana*, *S. sudetica* a *S. xdecipiens* nebylo možné spočítat (plody byly opadané nebo chyběl provázek), ale bylo zjevné, že strom plodí.

Dalším typem kontrolních křížení prováděných od roku 2016 byla samoopylená zakrytá křížení. Z roku 2015 existují data z jednoho květenství *S. sudetica*., které zůstalo zakryté a nepoužité pro žádnou kombinaci. Není ale zřejmé, jestli toto květenství bylo na jaře vybaleno a aktivně opyleno jiným květenstvím téhož jedince. Pokud nebyly vytvořeny žádné plody, lze se domnívat, že daný druh je selfinkompatibilní. Jde tedy o *S. aucuparia*, *S. gemella*, *S. aria*, *S. cuculifera*, *S. hybrida*, *S. × decipiens* a *S. torminalis* (viz Tab. 8).

rok	číslo	druh	počet květenství	počet květů	počet plodů	poměr plodů/květy	počet dobrých analýz
2016	59	<i>sudetica</i>	3	83	2	2%	23
2016	23	<i>danubialis</i>	1	100	22	22%	12
2015		<i>sudetica</i>	1	NA	NA	NA	5
2016	72	<i>pauca</i>	1	29	5	17%	5
2016	16	<i>alnifrons</i>	2	224	24	11%	3
2016	34	<i>bohemica</i>	3	156	69	44%	2
2016	53	<i>eximia</i>	2	95	4	4%	0
2016	62	<i>aucuparia</i>	2	330	0	0%	0
2016	54	<i>gemella</i>	2	150	0	0%	0
2016	17	<i>aria</i>	2	115	0	0%	0
2016	22	<i>cuculifera</i>	2	96	0	0%	0
2016	25	<i>hybrida</i>	1	88	0	0%	0
2016	57	<i>×decipiens (G-II)</i>	1	75	0	0%	0
2016	39	<i>×decipiens (O-II)</i>	1	70	0	0%	0
2016	27	<i>tormalis</i>	2	49	0	0%	0

Tab. 8: Počty květů a případně vytvořených plodů kontrolních samoopylených květenství. Uvedeno je i procentuální úspěšnost vytvoření plodů z květů. Pokud nejsou vytvořeny žádné plody, lze uvažovat, že daný druh je selfinkompatibilní.

Pouze v případě *S. eximia* byly vytvořeny plody, které neobsahovaly žádná semena. Pokud byla vytvořena nějaká semena, byla podrobena analýze průtokovou cytometrií a dále byl odvozen způsob jejich vzniku. Jednalo se o druhy *S.sudetica*, *S.danubialis*, *S.pauca*, *S.alnifrons* a *S.bohemica* (viz Tab. 9). Konkrétní způsoby vzniku semen odvozené z poměru embrya a endospermu jsou uvedeny v tabulce. Převažovala autonomní pseudogamie s použitím diploidního samčího příspěvku.

rok	druh	ploidie	počet semen	sex	autonomní pseudogamie - endosperm			
					2f+m	2f+2xm	3f+m	3f+2xm
2016	<i>bohemica</i>	3x	2	0	0	2	0	0
2016	<i>alnifrons</i>	3x	3	0	0	1	1	1
2016	<i>pauca</i>	4x	5	0	2	3	0	0
2015	<i>sudetica</i>	4x	5	1	0	4	0	0
2016	<i>danubialis</i>	4x	12	3	3	5	0	0
2016	<i>sudetica</i>	4x	21	0	2	19	0	0

Tab. 9: Přehled reprodukčních způsobů vytvořených semen kontrolních samoopylených květenství. Převažuje „autonomní pseudogamie“. Jde o pracovní název reprodukčního způsobu kdy poměr embrya ku

endospermu odpovídá pseudogamii, ale je jasné, že při tvorbě endospermu byl použit pyl pouze mateřské rostliny nikoli námi dodaného otce. U tetraploidů se i vzácně objevila autogamie.

Křížení s *Malus sargentii*

V sezóně 2016 bylo provedeno několik křížení s *Malus sargentii* coby donorem pylu pro další možné ověření Mentor efektu. Tento druh byl vybrán kvůli odlišné velikosti genomu, díky které je příspěvek tohoto jedince možné detekovat z přesných údajů embrya i endospermu a také jeho dostupnosti ve sbírce Dendrologické zahrady. V průběhu sezóny se ukázalo, že *Malus sargentii* rozkvétá o něco dříve než všechny druhy jeřábů, a proto byla květenství až do jejich použití při kontrolovaném křížení uchována v lednici, aby se jejich rozkvétání a dozrávání prašníku pozastavilo. V dalším roce byla upřednostněna křížení v rámci rodu *Sorbus*, proto dat z tohoto typu kontrol není mnoho (viz Tab. 10). Nicméně pokrývají všechny agregáty, které byly k dispozici.

druh	ploidie	počet květů	počet plodů	poměr plodů/květy	počet semen
<i>hybrida</i>	4x	140	35	25%	18
<i>sudetica</i>	4x	25	5	20%	2
<i>bohémika</i>	3x	80	29	36%	0
<i>aucuparia</i>	2x	170	0	0%	0
<i>×decipiens</i> (G-II)	2x	100	0	0%	0
<i>tormalis</i>	2x	70	0	0%	0
<i>aria</i>	2x	50	0	0%	0

Tab. 10: Počty květů a případně vytvořených plodů kontrolních křížení s *Malus sargentii*. Diploidní druhy netvořily žádné plody, triploidní *S. bohémika* tvořila plody bez semen a tetraploidní druhy tvořily i semena. Způsoby vzniku těchto semen jsou uvedeny dále.

Semena byla vytvořena v případě křížení se *S. sudetica*. V obou případech byl detekován velmi přesný poměr 4:12, což odpovídá autonomní pseudogamii – apomiktickému rozmnožování bez použití *Malus*. *S. sudetica* tvořil plody se semeny i v případě kontrolních samoopylených květenství, proto vytvoření semen v tomto případě není udivující a nemusí vůbec souviset s přítomností cizího pylu.

V dalším případě, křížení se *S. hybrida*, bylo vytvořeno 18 semen. V případě samoopyleného květenství se žádné plody nevytvořily. Můžeme tedy předpokládat, že pyl *Malus* indukoval samotný *S. hybrida* k interakcím s vlastním pylem. Konkrétně

byl detekován jeden případ apogamie, 5 autonomní pseudogamie s redukovaným a 12 s neredukovaným pylem.

počet semen	emb: end	embryo		Endosperm		typ rozmnožování
		F	m	f	M	
1	4:6	2	2	2+2	2	autogamie
5	4:10	4	0	4+4	2	autonomní pseudogamie s redukovaným pylem
12	4:12	4	0	4+4	2+2/4	autonomní pseudogamie s diploidním příspěvkem pylu

Tab. 11: Přehled detekovaných reprodukčních způsobů analyzovaných semen *S.hybrida* z kontrolního květenství ovlivněného *Malus sargentii*. Vzhledem k výsledkům kontrolního samoopyleného křížení *S. hybrida* (netvořily se žádné plody) se lze domnívat, že v tomto případě je přítomný Mentor efekt.

4.3.2 Reprodukční způsoby v rámci jednotlivých agregátů

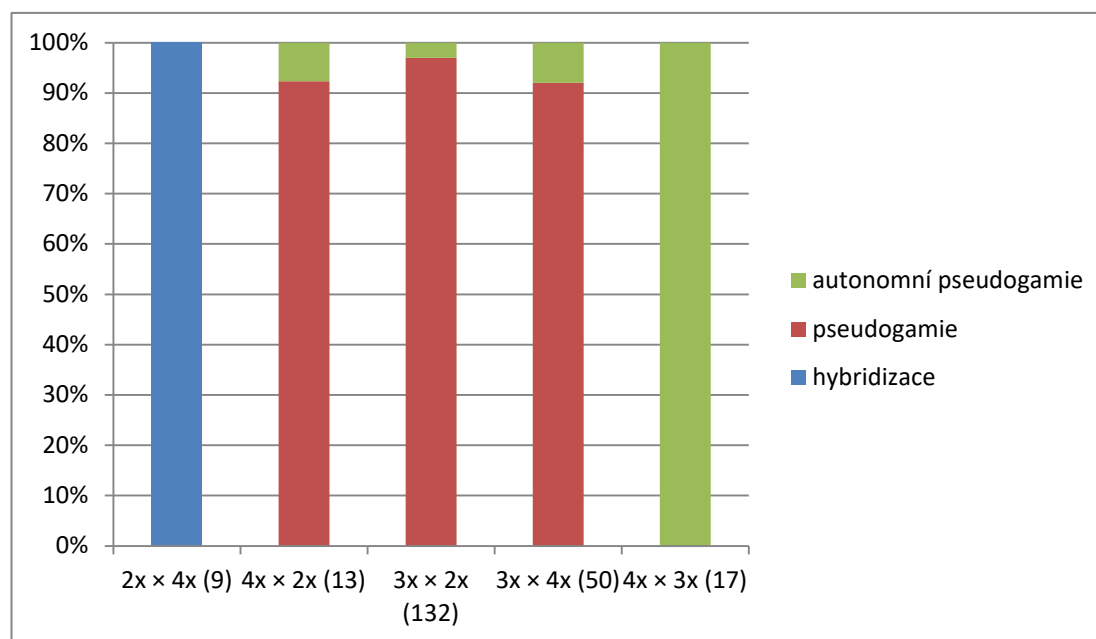
Data úspěšných kompletních analýz semen byla rozdělena do čtyř základních skupin reprodukčních způsobů bez ohledu na redukovanost nebo neredukovanost gamet. Prvním z nich bylo sexuální rozmnožování s využitím námi dodaného otcovského pylu (dále označeno jako hybridizace). V této situaci vzniklo embryo splnutím samičí a samčí gamety a endosperm také. Druhým případem byla standardní pseudogamie, tedy apomiktické rozmnožování s použitím námi dodaného otcovského pylu pouze pro vznik endospermu, kdy splývají centrální jádra zárodečného vaku se samčí gametou. Třetím případem je situace, dále pracovně označovaná jako „autogamní pseudogamie“. V tomto případě jde o typ apomiktického rozmnožování podobný jako v předchozím případě jen s tím rozdílem, že jako donor pylu funguje mateřská rostlina. Posledním rozlišovaným druhem byla prostá autogamie, tedy typ sexuálního rozmnožování za účasti gamet pouze mateřské rostliny.

4.3.2.1 Hybridizace v rámci *S. aria* agg.

Při křížení diploidní *S. aria* (matka) s tetraploidní *S. danubialis* (otec) byla u všech analýz semen detekována hybridizace. V opačném směru křížení ve většině případů proběhla pseudogamie, apomiktické rozmnožování spojené s oplozením centrálních jader zárodečného vaku. Stejně tomu bylo při křížení, v nichž byla mateřskou rostlinou triploidní *S. cucullifera* a to s otcem diploidem i tetraploidem. Poslední kombinací v rámci *S. aria* agg. bylo křížení tetraploida (matka) s triploidem (otec), kdy do-

daný pyl triploidní *S. cucullifera* nebyl pro tvorbu embrya ani endospermu vůbec využit.

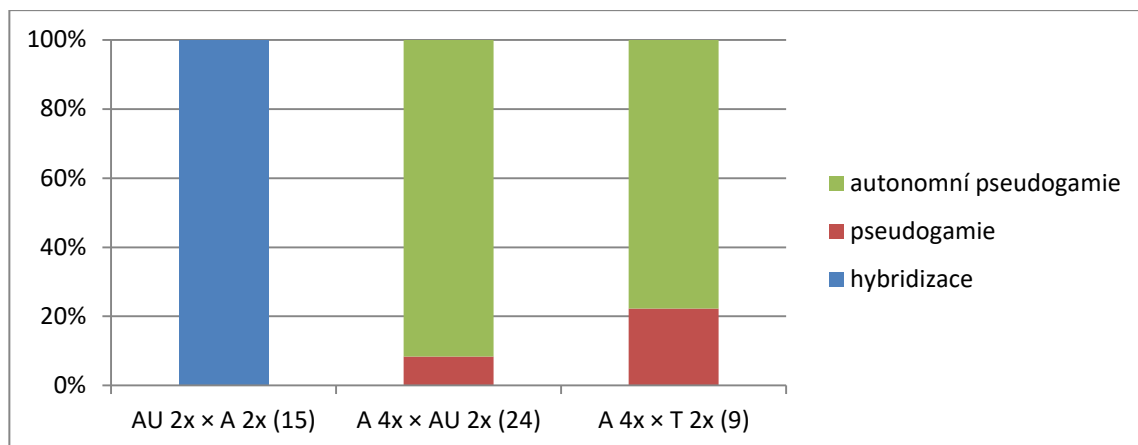
V rámci této skupiny proběhlo ještě křížení diploida s triploidem. Z tohoto křížení (na dvou květenstvích) vznikl pouze jeden plod, který ale neobsahoval žádná analyzovatelná semena.



Obr. 7: Pozitivní výsledky analýz semen vzniklých křížením v rámci *S.aria* agg. ploidie matky × ploidie otce (počet semen). Výsledky byly rozděleny do čtyř skupin pracovně nazvaných „hybridizace“ (sexuální rozmnožování s dodaným otcovským pylem); „pseudogamie“ (klasická pseudogamie, dodaný otcovský pyl se podílel na tvorbě endospermu); „autonomní pseudogamie“ (poměr embrya ku endospermu odpovídá pseudogamii bez použití dodaného pylu, na tvorbě endospermu se podílel pyl mateřského jedince) a „autogamie“ (klasická samosprašnost). Při křížení *S. aria* (2x, matka) se *S. danubialis* (4x, otec) byla ve všech případech detekována hybridizace. V opačném směru se žádná hybridizace nevyskytla.

4.3.2.2 Sexuální druhy mezi sebou

Samozřejmě jsme zkoušeli křížení základních sexuálních druhů mezi sebou. Nejúspěšnější bylo křížení *S.aucuparia* (2x) s diploidní *S.aria* coby donorem pylu. Další úspěšná interakce proběhla i v opačném směru a dále pak také mezi tetraploidem *S.aria* agg. a *S.torminalis*.



Obr. 8: Pozitivní výsledky analýz semen vzniklých křížením mezi základními druhy rodu *Sorbus*. Druh a ploidie matky × druh a ploidie otce (počet semen); AU – *S.aucuparia*; A – *S.aria* agg.; T – *S.torminalis*. Výsledky byly rozděleny do čtyř skupin pracovně nazvaných „hybridizace“ (sexuální rozmnožování s dodaným otcovským pylem); „pseudogamie“ (klasická pseudogamie, dodaný otcovský pyl se podílel na tvorbě endospermu); „autonomní pseudogamie“ (poměr embrya ku endospermu odpovídá pseudogamii bez použití dodaného pylu, na tvorbě endospermu se podílel pyl mateřského jedince) a „autogamie“ (klasická samosprašnost). Hybridizace byla detekována v případech křížení, v nichž byl *S. aria* donorem pylu.

Druhé křížení mezi *S.aria* agg., tentokrát diploidní, a *S.torminalis* sice vytvořilo plody, ale ty neobsahovaly žádná analyzovatelná semena. V dalších proběhlých zkoušených kombinacích nebyly vytvořeny žádné plody.

Matka	ploidie matky	otec	ploidie otce
AU	2x	A	4x
A	2x	AU	2x
T	2x	AU	2x
T	2x	A	2x
T	2x	A	4x

Tab. 12: Negativní výsledky křížení mezi základními druhy AU – *S. aucuparia*; A – *S. aria* agg.; T – *S. torminalis*. Přehled uskutečněných křížení uvnitř *S. aria* agg. jenž nevytvořila žádné plody.

4.3.2.3 Hybridogenní agg. s rodičovskými druhy - zpětné křížení

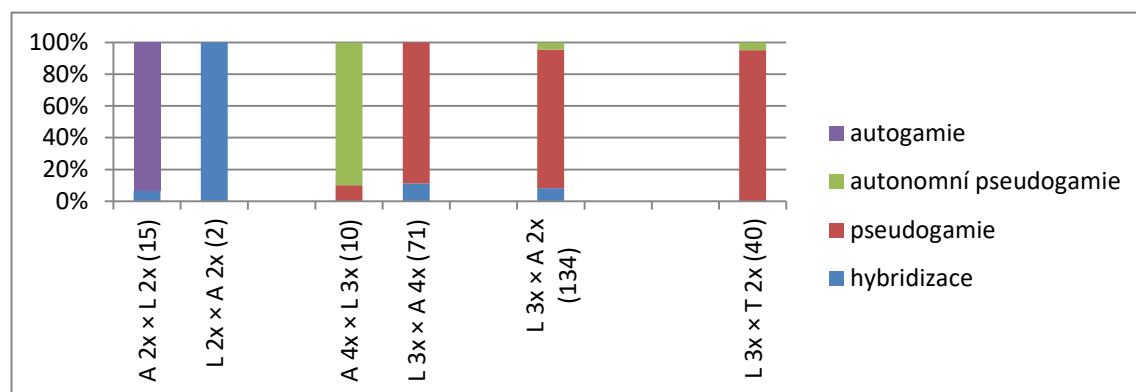
Další skupinou kombinací bylo zpětné křížení zástupců hybridogenních agregátů s jejich rodičovskými druhy. Výsledky dále uvádím rozdělené podle jednotlivých agregátů. Nejvíce kombinací proběhlo mezi druhy *S. latifolia* agg. a jeho rodičovskými dru-

hy z několika důvodů. Hlavním z nich je širší zastoupení tohoto agregátu ve sbírkách zahrady a možnost vytvoření většího počtu kombinací.

***Sorbus latifolia* agg.**

Některé výsledky v rámci křížení *S. latifolia* agg. s rodiči poskytují možnost sledování křížení v obou směrech prováděného opylování a ukazují, že jednoznačně záleží na tom, který druh je otcem a který matkou. V případě křížení diploidní *S. aria* s diploidním primárním hybridem, byl zaznamenán jen jeden případ hybridizace, zatímco v opačném směru v obou vzniklých semenech. Samozřejmě je těžké tento výsledek přesvědčivě interpretovat, když byla vytvořena jen 2 semena, ale můžeme se domnívat, že pokud je *S. aria* donorem pylu, častěji proběhne hybridizace. To ukazuje i další případ křížení triploida z *S. latifolia* agg. s tetraploidem ze *S. aria* agg., kdy opět v případě otce *S. aria* byla detekována hybridizace (v 11% případů) a v opačném směru nikoliv. Poslední křížení mezi *S. latifolia* a *S. aria* opět v 8% ukázalo hybridizaci.

Při křížení s druhým rodičovským druhem, *S. torminalis*, vznikla semena pouze v případě křížení triploida *S. latifolia* a v převážné většině případů (95%) byla detekována pseudogamie.



Obr. 9: Pozitivní výsledky analýz semen vzniklých křížením zástupců *S. latifolia* agg. s rodičovskými druhy. Druh a ploidie matky × druh a ploidie otce (počet semen). A – *S. aria* agg.; L – *S. latifolia* agg.; T – *S. torminalis*. Je patrné, že v případech kdy je *S. aria* agg. donorem pylu, probíhá hybridizace častěji. Výsledky byly rozděleny do čtyř skupin pracovně nazvaných „hybridizace“ (sexuální rozmnožování s dodaným otcovským pylem); „pseudogamie“ (klasická pseudogamie, dodaný otcovský pyl se podílel na tvorbě endospermu); „autonomní pseudogamie“ (poměr embrya ku endospermu odpovídá pseudogamii bez použití dodaného pylu, na tvorbě endospermu se podílel pyl mateřského jedince) a „autogamie“ (klasická samosprašnost).

V tomto agregátu se také ukázalo, že některá křížení vytvořila plody a semena pouze v jednom květenství a dalších nevytvořila plody vůbec, v případech obou směrů diploidních *S. aria* a *S. latifolia* agg. a triploidní *S. latifolia* agg. coby matkou a diploidní *S. torminalis*.

Nevytvoření plodů v žádném případě byly oba směry triploidní *S. latifolia* a *S. torminalis*. Další byly případy, kdy vznikly plody, které neobsahovaly semena, bylo křížení diploidní *S. aria* s triploidní *S. latifolia* agg., kdy byl vytvořen 1 plod a dále *S. torminalis* s diploidní *S. latifolia*, kdy vzniklo plodů 9.

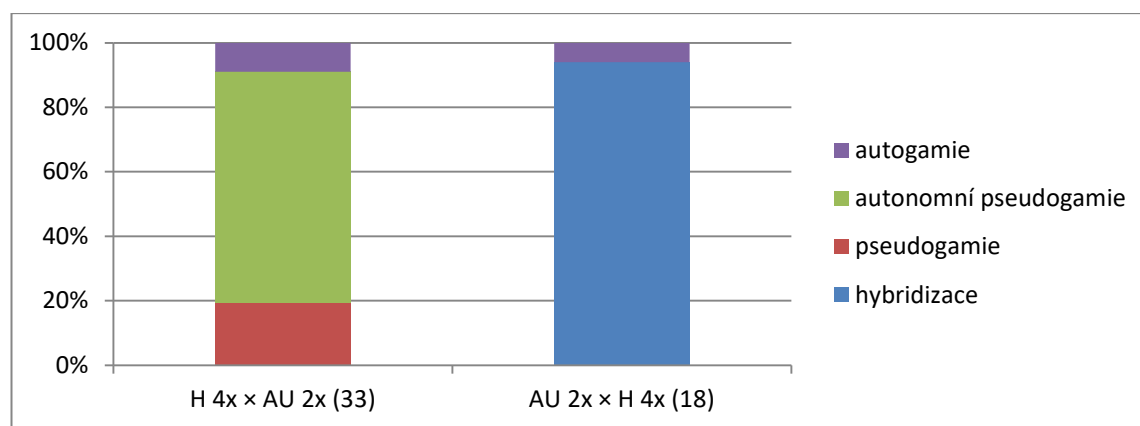
matka	ploidie matky	Otec	ploidie otce	vzniklé plody	plody v jiném květenství
A	2x	L	2x	0	15
L	2x	A	2x	0	2
L	3x	T	2x	0	40
L	3x	T	2x	0	0
T	2x	L	3x	0	0
A	2x	L	3x	1	0
T	2x	L	2x	9	0

Tab. 13: Negativní výsledky křížení *S. latifolia* agg. s rodičovskými druhy. L – *S. latifolia* agg.; A – *S. aria* agg.; T – *S. torminalis*. Přehled uskutečněných křížení se *S. latifolia* agg., která netvořila žádná semena.

***Sorbus hybrida* agg.**

V rámci tohoto agregátu proběhlo křížení se *S. aucuparia* v obou směrech. V případě, kdy byla matkou, proběhla hybridizace. Další křížení této kombinace ale žádné plody nevytvořilo.

Další kombinací, která nevytvořila žádné plody bylo křížení se *S. aria* v obou směrech.

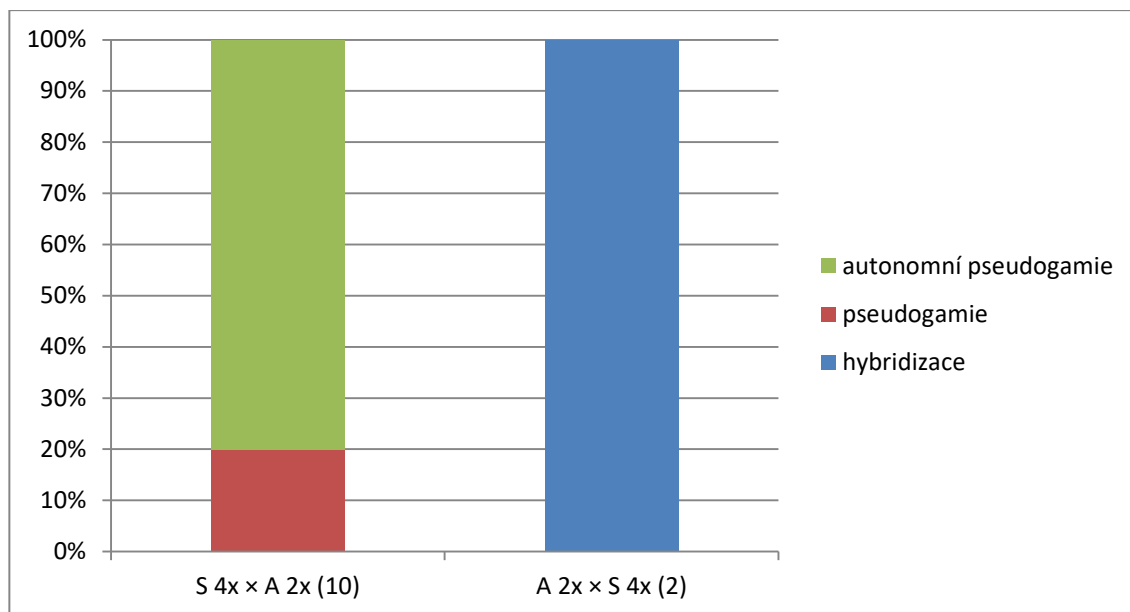


Obr. 10: Pozitivní výsledky analýz semen vzniklých křížením zástupců *S. hybrida* agg. s rodičovským *S. aucuparia*. Druh a ploidie matky × druh a ploidie otce (počet semen). H – *S. hybrida* agg.; AU – *S. aucuparia*. Křížení s druhým rodičovským druhem *S. aria* nevytvořilo žádné plody. Výsledky byly rozděleny do čtyř skupin pracovně nazvaných „hybridizace“ (sexuální rozmnožování s dodaným otcovským pylem); „pseudogamie“ (klasická pseudogamie, dodaný otcovský pyl se podílel na tvorbě endospermu); „autonomní pseudogamie“ (poměr embrya ku endospermu odpovídá pseudogamii bez použití dodaného pylu, na tvorbě endospermu se podílel pyl mateřského jedince) a „autogamie“ (klasická samosprašnost).

***Sorbus sudetica* agg.**

Ve sbírce Dendrologické zahrady v Průhonicích bohužel chybí *S. chamaemespilus*, rodičovský druh *S. sudetica* agg., který se na našem území nevyskytuje. Nejblíže ho můžeme najít v Karpatech nebo Alpách. Naši snahou bylo ho do sbírky získat, zatím ale bohužel neúspěšně.

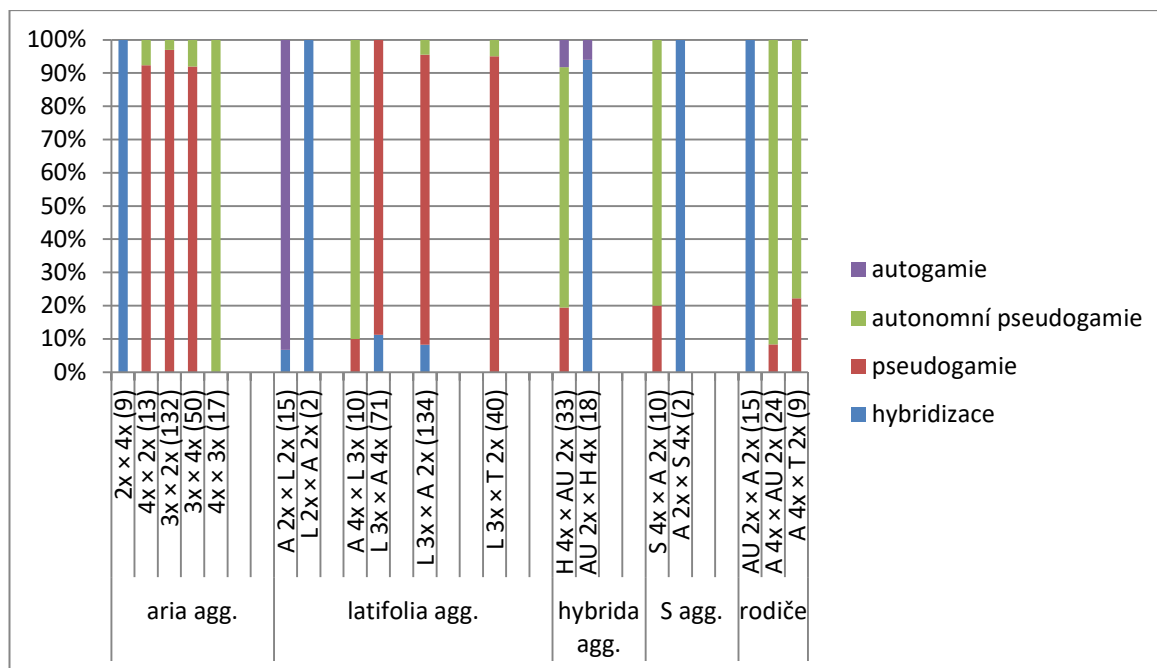
I přes tento nedostatek jsme provedli křížení alespoň se *S. aria* a to v obou směrech. Bohužel bylo vytvořeno jen malé množství semen. V obou případech, kdy byla *S. sudetica* donorem pylu, byla detekována hybridizace, což je opačný případ než křížení *S. aria* se *S. latifolia* agg. Další květenství kombinace *S. aria* se *S. sudetica* plody nevytvořilo.



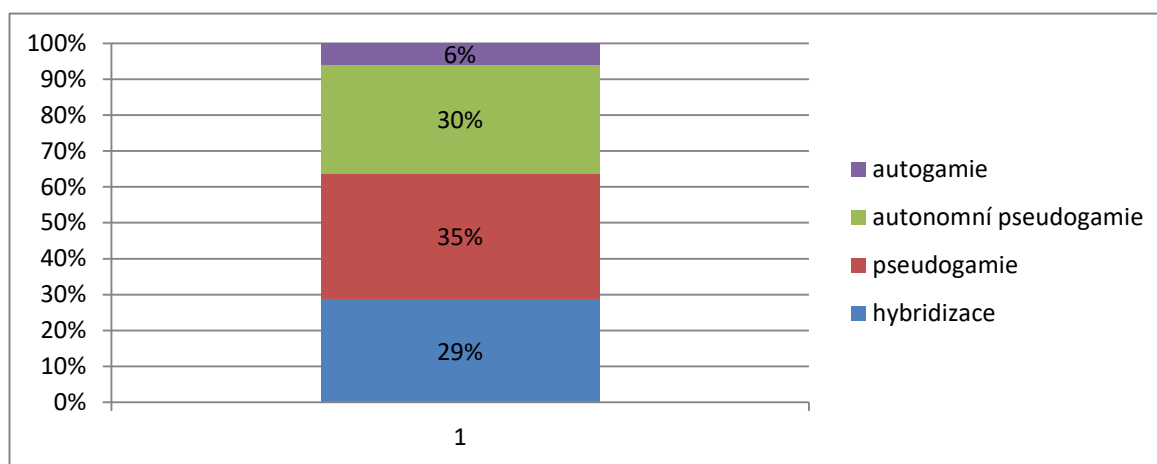
Obr. 11: Pozitivní výsledky analýz semen vzniklých křížením zástupců *S. sudetica* s rodičovským *S. aria*. Druh a ploidie matky × druh a ploidie otce (počet semen). S – *S. sudetica*; A – *S. aria* agg. Křížení s druhým rodičovským druhem *S. chamaemespilus* nebylo možné s důvodu chybějícího zástupce ve sbírce Dendrologické zahrady. Výsledky byly rozděleny do čtyř skupin pracovně nazvaných „hybridizace“ (sexuální rozmnožování s dodaným otcovským pylem); „pseudogamie“ (klasická pseudogamie, dodaný otcovský pyl se podílel na tvorbě endospermu); „autonomní pseudogamie“ (poměr embrya ku endospermu odpovídá pseudogamii bez použití dodaného pylu, na tvorbě endospermu se podílel pyl mateřského jedince) a „autogamie“ (klasická samosprašnost).

4.3.2.4 Shrnutí reprodukčních strategií

U většiny křížení byla detekována více než jedna reprodukční strategie. Nejčastější byly různé varianty pseudogamie. Nejčastěji se vyskytovala v rámci křížení uvnitř *S. aria* agg. a v křížení se *S. latifolia* agg. Nejvzácněji se vyskytovala autogamie. Dle očekávání se hybridizace vyskytovala v případech, kdy byl v otcovském genomu zastoupen *S. aria* (buď přímo zástupcem *S. aria* agg., nebo jako subgenom zástupců *S. hybrida* agg.).



Obr. 12: Porovnání reprodukčních strategií všech agregátů. Výsledky byly rozděleny do čtyř skupin pracovně nazvaných „hybridizace“ (sexuální rozmnožování s dodaným otcovským pylem); „pseudogamie“ (klasická pseudogamie, dodaný otcovský pyl se podílel na tvorbě endospermu); „autonomní pseudogamie“ (poměr embrya ku endospermu odpovídá pseudogamii bez použití dodaného pylu, na tvorbě endospermu se podílel pyl mateřského jedince) a „autogamie“ (klasická samosprašnost).



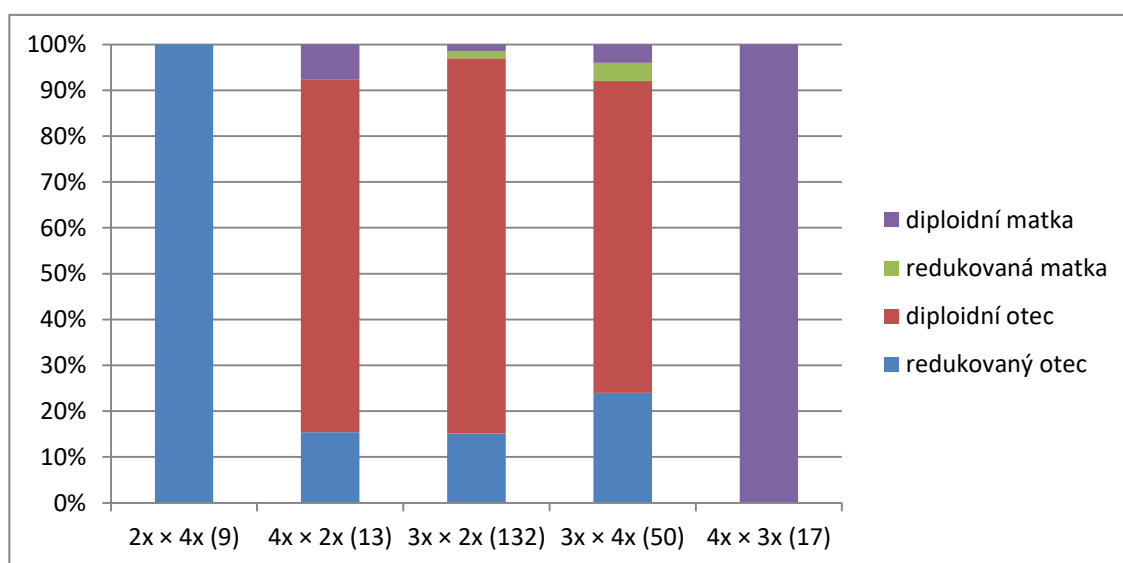
Obr. 13: Shrnutí zastoupení jednotlivých skupin reprodukčních strategií všech semen. Vzácně zastoupená je autogamie, pouze v 6 % případů. Zbylé 3 skupiny jsou zastoupeny téměř rovnoměrně kolem 30%. Výsledky byly rozděleny do čtyř skupin pracovně nazvaných „hybridizace“ (sexuální rozmnožování s dodaným otcovským pylem); „pseudogamie“ (klasická pseudogamie, dodaný otcovský pyl se podílel na tvorbě endospermu); „autonomní pseudogamie“ (poměr embrya ku endospermu odpovídá pseudogamii bez použití dodaného pylu, na tvorbě endospermu se podílel pyl mateřského jedince) a „autogamie“ (klasická samosprašnost).

4.3.3 Neredukované gamety

Velmi častým jevem při vzniku endospermu byl také tzv. diploidní příspěvek otcovského jedince. Může jít buď o neredukované gamety, nebo o použití dvou redukovaných samčích gamet. Z celkového počtu 481 semen se jednalo o 349 případů. Podrobněji je tento jev rozebrán v Diskuzi.

4.3.3.1 V rámci *S. aria* agg.

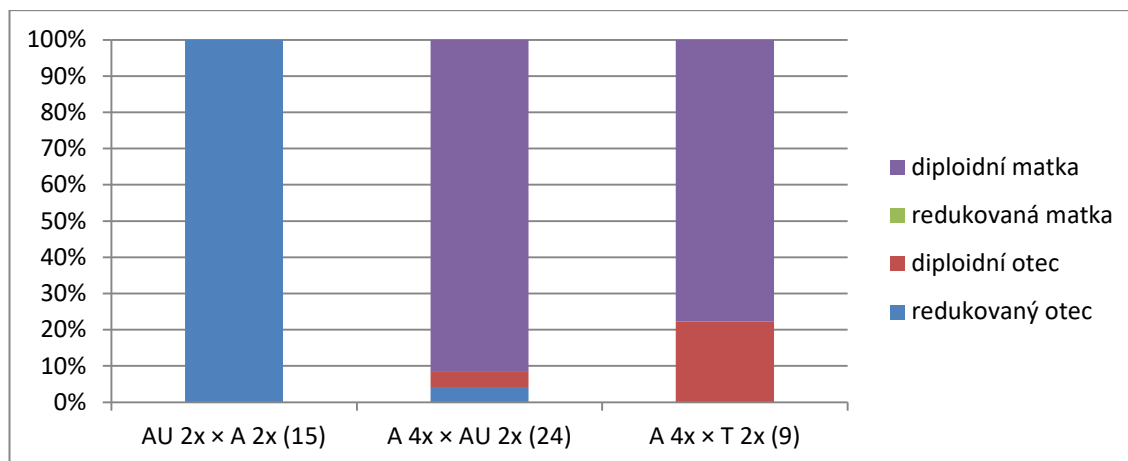
V rámci *S. aria* agg. převažovaly situace, kdy byl jako donor pylu použit námi přidaný otcovský jedinec. V případech křížení 2x a 4x, kdy proběhla hybridizace byly gamety redukované. Naopak v případě křížení 4x s 3x, kdy proběhla autonomní pseudogamie, byla donorem pylu mateřská rostlina, a to buď jednou neredukovanou gametou, nebo dvěma redukovanými. V ostatních případech byla značná variabilita, ale převažoval diploidní příspěvek otcovského jedince.



Obr. 14: Variabilita příspěvku pylu pro vnik endospermu při křížení v rámci *S.aria* agg. Ploidie matky x ploidie otce (počet semen).

1.1.1.1. Mezi základními druhy

I zde se potvrdilo, že pokud jde o sexuální rozmnožování, vždy se jedná a redukované gamety. U této skupiny v případě křížení *S. aucuparia* se *S. aria*. V případech autonomní pseudogamie také opět převažovaly diploidní příspěvky mateřské rostliny.

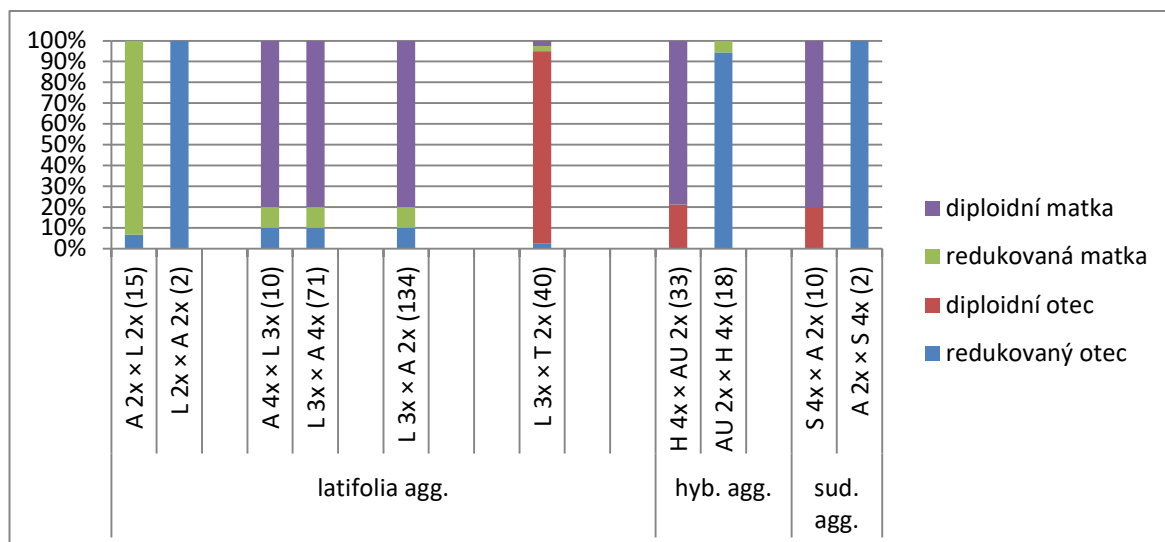


Obr. 15: Variabilita příspěvku pylu pro vznik endospermupři křížení mezi základními druhy rodu *Sorbus*. Ploidie matky x ploidie otce (počet semen).

4.3.3.2 Situace křížení hybridogenních agg. s rodiči

V jednotlivých kříženích hybridogenních agregátů s rodičovskými druhy byla situace obdobná. Pokud šlo o sexuální rozmnožování, a to jak hybridizaci, tak autogamii, donor pylu měl jistě redukované gamety.

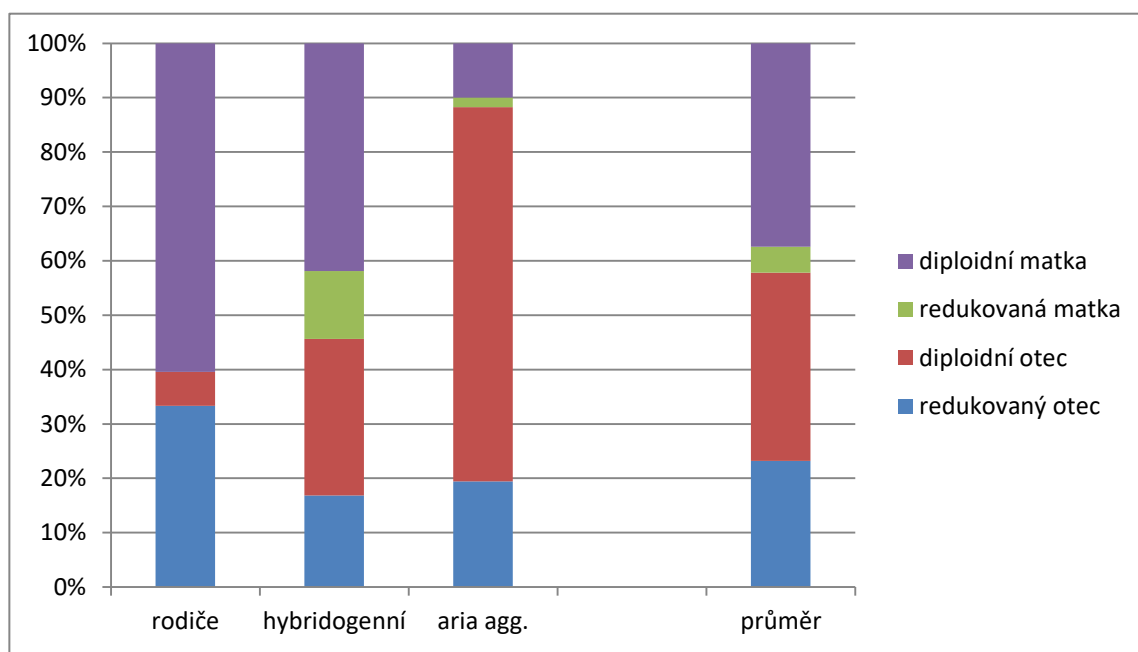
Variabilita se ukázala při pseudogamii, kdy ale převažovaly případy autogamní pseudogamie a tak donorem pylu byla častěji mateřská rostlina. Nejčastěji byl zaznamenán diploidní příspěvek mateřské rostliny.



Obr. 16: Variabilita příspěvku pylu pro vznik endospermu při křížení mezi hybridogenními agregáty a jejich rodičovskými druhy. Ploidie matky x ploidie otce (počet semen).

4.3.3.3 Shrnutí

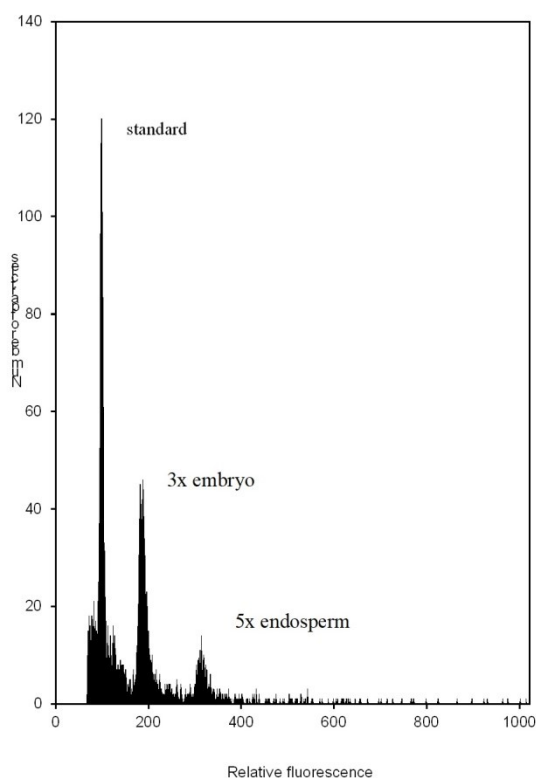
Zdánlivě neredukované gamety pro tvorbu endospermu se vyskytovaly velmi často. Při křížení rodičovských druhů mezi sebou jsme mohli častěji zaznamenat tento jev u mateřských jedinců, naopak při křížení v rámci *S. aria* agg. u otců. Více v Diskuzi.



Obr. 17: Shrnutí zastoupení gamet při vzniku endospermu. Celkově se velmi často objevoval zdánlivě neredukovaný pyl, nazývaný diploidní příspěvek. Při křížení základních druhů ho tvořily spíše mateřské rostliny. Při křížení v rámci *S. aria* agg. spíše dodaný otcovský pyl. Více v Diskuzi.

4.3.3.4 U matky – pouze v jednom případě – *S. aria*

Velmi unikátním případem bylo detekování neredukované samčí gamety *S. aria* v jednom semeni křížení se *S. ×decipiens*. Detekované embryo bylo tedy 3x a vzniklo splynutím neredukované gamety *S. aria* (2x) a redukované *S. ×decipiens* (1x). Endosperm 5x vznikl splynutím 2 buněk centrálního jádra *S. aria* (2x+2x) a jedné redukované gamety *S. ×decipiens* (1x).



Obr. 18: Histogram analýz semene vyniklého křížem *S. aria* (2x, matka) se *S. ×decipiens* (2x, otec). Jako standard byla použita *Carex acutiformis*. Byl zaznamenán unikátní poměr 3x embryo: 5x endosperm, což značí pravděpodobně účast neredukovaných mateřských gamet *S. aria* při tvorbě embrya i endospermu.

5 Diskuze

5.1 Shrnutí výsledků

Variabilita reprodukčních způsobů v rámci rodu *Sorbus* je napříč testovanými skupinami velmi vysoká, ať už jde o křížení základních druhů mezi sebou, hybridogenních agregátů s rodičovskými druhy, nebo křížení uvnitř *S. aria* agg. Hybridizace byla zachycena přibližně ve třetině analyzovaných semen. Ve všech kříženích s hybridizací se vyskytla *S. aria* agg., kromě *S. aucuparia* × *S. hybrida* (jedním z jejich rodičů je také zástupce *S. aria* agg). Je tedy zřejmé, že *S. aria* agg. má výjimečnou pozici v rámci celého rodu *Sorbus*. Autogamie byla zaznamenána u pouhých 6 % semen. Zbylou variabilitu tvořily různé druhy pseudogamie za účasti různého počtu redukovaných i neredukovaných gamet obou rodičů. Velmi častým zaznamenaným jevem byl tzv. diploidní příspěvek otcovského jedince, který se podílel na tvorbě endospermu.

5.2 Kontext jiných fakultativně apomiktických skupin

Pro srovnání bylo vybráno několik zástupných fakultativně apomiktických skupin rostlin, u nichž byla prováděna experimentální hybridizace a další studium reprodukčních způsobů a to nejen v nedávné době. Z toho úhlu pohledu je vidět jistý dluh vědy ve studiu rodu *Sorbus*. Logickým důvodem je jistě nemožnost provádění klasických hybridizačních pokusů s výsevem semen a čekání na semenáče vzniklé generace z důvodu délky generační doby. Námi zvolený přístup, analýza vzniklých semen metodou průtokové cytometrie (FCSS), ale umožnil tento problém obejít, a tak získat výsledky křížení rovnou ze semen bez nutnosti dalšího klíčení, sázení a růstu.

5.2.1 *Pilosella*

Prvním příkladem je rod *Pilosella*. Experimentální křížení prováděná v tomto rodu mají obdobné pattern jako naše studie v rodu *Sorbus*. První známá experimentální křížení byla prováděna už v druhé polovině 19. století (Nägeli and Peter 1885). Byla zde zaznamenána i obdobná vysoká variabilita reprodukčních způsobů, ne-li vyšší. Celkový podíl sexuálně vzniklých semen v tomto rodu je ale vyšší než v našem experimentálním křížení rodu *Sorbus* (Krahulcová et al. 2009).

Úzké pojetí druhu v této skupině se ukázalo jako nepraktické s ohledem na komplexnost skupiny a vysokou míru hybridizace. Proto byl vytvořen koncept širších skupin (Bräutigam and Greuter 2007). Takové pojetí taxonomie by možná bylo vhodné zavést i v rodu *Sorbus*.

5.2.2 *Hieracium*

U diploidních druhů v experimentálním křížení rodu *Hieracium* byla zaznamenána striktní sexualita. Zajímavá situace ale nastala u polyploidních jedinců, tri- a tetraploidů, u nichž se sexuální rozmnožování vyskytovalo velmi vzácně, pouze u 0,4% případů. Data z tohoto experimentálního křížení ukázala, že polyploidní rostliny jsou převážně apomiktické, ale zachovávají si velmi výjimečnou sexualitu, díky níž je možný vznik enormní variability (Mráz and Zdvořák 2018). V našem případě bylo u rodu *Sorbus* zaznamenáno sexuálního rozmnožování u polyploidů častěji.

5.2.3 *Alchemilla*

Rod *Alchemilla* je v Evropě zastoupen pouze jedním sexuálním druhem *A. pentaphyllea*; (Tutin et al. 1968; Fröhner 1990). S ostatními evropskými druhy, obligátními apomikty, si je navíc tento sexuál velmi málo příbuzný (Kurtto et al. 2009). Obligátně apomiktičtí jedinci jsou zřejmě až terciérního stáří, což odporuje představě, že apomixie není pro rostliny dlouhodobě udržitelná (Hörandl 2011).

5.2.4 *Rubus*

Reprodukční způsoby rodu *Rubus* jsou velmi podobné jako u rodu *Sorbus*. Variabilita je velmi vysoká, zejména díky mnoha druhům apomixie. Speciálním případem, který jsme v našem experimentálním křížení nezaznamenali, je automixie. Jde o případ samoopylení, při němž splynou pouze dvě redukovaná jádra centrálního zárodečného vaku. Žádný pyl se tedy na vzniku potomstva nepodílí. (Antonius and Nybom 1995)

5.3 Úskalí a výhody metodiky

5.3.1 Mikrosatelity

Výběr používaných mikrosatelitových markerů proběhl na základě výsledků předchozích studií, hlavně dle Bílé (2015). I přesto bylo nutné vybrané markery otestovat na více zástupcích napříč jednotlivými skupinami druhů. V důsledku toho se prodloužila celková předpokládaná doba nutná k získání výsledků.

Dalším úskalím použité metody na velmi rozmanitý soubor druhů byla nutnost výběru dostatečně obecných markerů. Pro náš účel pouhého ověření příslušnosti k jednotlivým druhům byl výběr dostatečný. Podrobnější analýzy ale nejsou možné.

Zásadní výhodou vybrané použité metody je její rychlost a nepříliš složitá laboratorní práce.

5.3.2 Experimentální hybridizace a FCSS

Jedním z nedostatků použité metody byl fakt, že jednotlivé druhy mají posunutou fenologii. Nejvíce posunutou dobu kvetení má v přírodě i ve sbírkách *S. torminalis*, který začíná kvést vždy nejméně o týden až dva dříve. Z toho důvodu jsme některá květenství sbírali dříve, pozastavili jejich růst v lednici a těsně před zamýšlením opylením nechali dozrát při laboratorní teplotě. Neúspěch křížení s tímto druhem by tedy mohl být způsobený tím. Dalším druhem s dřívějším kvetením je *S. sudetica* s.str., která ale problémy s tvorbou semen neměla v žádném křížení, takže nejspíš ani v případě *S. torminalis* nemusel mít zvolený přístup negativní efekt.

Dalším problémem experimentálního křížení bylo občasné napadení květů i plodů hmyzími škůdci, případně jiná kontaminace. V roce 2016 jsme na nejpostiženější strom *S. torminalis* nanášeli insekticidní postřik, který ale nebyl příliš účinný.

Poslední komplikací, která se týkala kontrolních nezakrytých květenství, byl fakt, že v době sběru plodů byla některá plodenství opadaná, nebo sezobaná ptáky. Vždy ale šlo určit, jestli strom celkově plodí nebo ne, jen nebylo možné dostat konkrétní počty plodů kontrolních květenství. Proto se s těmito kvantitativními údaji dále nepracovalo.

Díky rozsáhlé sbírce bylo možné uskutečnit křížení i těch druhů, které se v současné době v přírodě nevyskytují na svých kontaktních zónách. Z modelových studií krajiny glaciálu ale můžeme soudit, že právě v glaciálu a časném interglaciálu příležitosti ke kontaktu měly (Chytrý et al. 2008). V dnešní době se často zástupci rodu *Sorbus* vyskytují na reliktních stanovištích, lemech primárního bezlesí. Takovým příkladem může být naše známá hybridní *S. sudetica* s.str, jejíž rodičovské druhy se v jejím nejbližším okolí v současnosti nevyskytují (Kovanda 1965).

Nedostatkem sbírky v Dendrologické zahradě jsou chybějící zástupci *S. chamaespilus*. O získání zástupců tohoto druhu bylo usilováno, ale ukázalo se jako zatím příliš obtížné. Hlavním důvodem kromě zákonné ochrany je skutečnost, že velmi pravděpodobně *S. chamaespilus* není kompaktním druhem, ale agregátem větších i menších taxonů, který svou komplexností odpovídá *S. aria* agg. (Lepší et al. ústní sdělení). Bylo by tedy obtížné vůbec správně vybrat vhodného reprezentativního zástupce. Před případným pokračováním této experimentální hybridizace by tedy bylo třeba nejdříve zmapovat variabilitu uvnitř tohoto agregátu.

Použitím metody FCSS jsme byli schopni velmi rychle získat výsledky o původu vzniklých jedinců, přičemž nebylo třeba semena vystavovat složitému a mnohdy neúspěšnému procesu vysévání a pěstování semenáčů. Díky tomu bylo také možné získat v krátkém čase ohromné množství dat.

5.4 Mentor efekt

Okrajové výsledky experimentu se týkají kontrolních křížení s *Malus sargentii*, která měla potvrdit přítomnost Mentor efektu i v rámci rodu *Sorbus*. V přírodě je tento jev značně podceněný, a vliv cizích pylů pohybujících se volně po krajině často není brán v potaz. V experimentálních podmínkách se mentor efektu věnovali například Krahulcová et al. na rodu *Pilosella* (1999) a Mráz na rodu *Hieracium* (2003). Výsledky experimentálních studií je třeba brát s rezervou, protože na rozdíl od volné krajiny ke květům přidáváme pyl pouze jednoho námi vybraného druhu. Tyto výsledky tedy nelze zobecnit na interakce s pylem větší škály druhů rostlin.

V našich pokusných kříženích se mentor efekt jasně ukázal pouze u křížení se *S. hybrida*., která vytvořila v interakci s *Malus sargentii* 18 semen a v kontrolních samoopylených květenstvích nevznikla semena žádná.

5.5 Neredukované gamety

Na základě dosud známých studií se domníváme, že pravděpodobnost tvorby neredukovaných samčích gamet není příliš vysoká. Jedním z důvodů, vyplývajícím i z našich výsledků, je nezaznamenání neredukovaných gamet účastných na tvorbě embrya. Dále pak tak soudíme na základě cytometrických analýz pylu prováděných v tomto rodu (Bílá 2015).

Pravděpodobnější variantou se zdá být opylení dvěma redukovanými samčími gametami.

5.6 Tři centrální jádra

Speciálními případy, vyskytující se v 16 semenech napříč agregáty, byly poměry odpovídající účasti tří centrálních jader mateřské rostliny tvorby endospermu. Takové případy jsou známy z předchozích studií (Jankun and Kovanda, 1986; Campbell et al., 1987, Bílá 2015), a i my se k tomuto vysvětlení přikláníme. Díky tomu jsme tedy mohli vysvětlit apomiktické poměry jako 3:10, 3:11, 4:13, 4:14 a jeden sexuální, 5:11.

5.7 Reprodukční způsoby

Tento hybridizační experiment potvrdil, že variabilita reprodukčních způsobů v rámci rodu *Sorbus* je velmi široká. Převážná většina kombinací je fakultativně apomiktická a sexualita druhů je ve značné menšině. Širokou škálu variability tvoří různé typy apomixie (Bílá 2015, Lepší et al. unpubl.)

Hybridizační experiment ukázal, že hybridizace probíhá napříč všemi dosud stanovenými skupinami druhů. Skupina *Malineae* je polyfyletická. Současné striktní úsilí vytvořit přirozené taxony by vedlo k vytvoření řady monotypických rodů.

Obdobná situace je na úrovni druhů. Typickým příkladem lokálního stenoendemického druhu je bezděžský *S. pauca*, který se vyskytuje v počtu 14 dospělých jedinců pouze na svazích Bezdězu (Lepší et al. 2013).

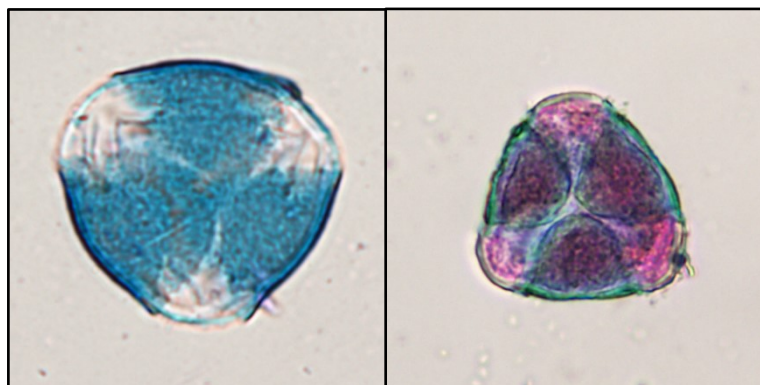
Směrem na jihovýchod Evropy se místo dobře izolovaných lokálních stenoendemitů vyskytují hybridní roje, a tak se určení jedinců komplikuje. Setkáváme se s fakultativně apomiktickými jedinci, kteří jsou v zásadě neurčitelní a nezařaditelní do současného systému taxonomického pojetí rodu *Sorbus* (Bílá 2015; Lepší et al. 2015, ústní sdělení).

Naše výsledky tedy přispívají svým drobným způsobem k nabourání samotného druhového konceptu rodu *Sorbus* a štěpení na drobné endemické taxony není zřejmě udržitelné. Z praktického determinačního hlediska by stálo za zvážení širší taxonomické pojetí jednotlivých druhů. Inspirací může být například širší druhový koncept v rodu *Pilosella*, kde bylo pragmaticky přistoupeno k širěji pojatým skupinám (Bräutigam and Greuter 2007).

5.8 Možné navázání

V tomto hybridizačním experimentu by bylo jistě zajímavé pokračovat a dokončit hlavně neproběhlé kombinace ze sezóny 2017. Díky tomu by bylo možné získat ucelenější obraz zvláště o symetrii křížení zvolených druhů.

Dalším možným navázáním by mohla být studie fertility pylu, díky které by výsledky křížení poskytly komplexnější přehled o možnostech jejich reprodukčních způsobů. Barvení a počítání pylu bylo v sezóně 2017 započato, ale bohužel nebylo dokončeno do prezentovatelné fáze kvantifikovaných výsledků. Bylo zvoleno Alexandrovo barvení.



Obr. 19: Obrázek abortovaného a vitálního pylu rodu *Sorbus*. Studium fertility pylu bylo zahájeno a dokončení by přineslo ucelený pohled na reprodukci v celém rodu.

Při testování a optimalizování metodiky byl zběžně prohlédnut pyl všech zástupců používaných stromů. Na první pohled nebyl detekován rozdíl v poměru vitálního a abortovaného pylu mezi jednotlivými druhy rodu *Sorbus*. Takové výsledky by odpovídaly studiím u rodu *Pilosella*, kde byl alespoň částečně fertilní pyl potvrzen u většiny druhů používaných v experimentálních kříženích (Krahulcová and Krahulec 2000).

Pokračovat ve studování reprodukčních způsobů u rodu *Sorbus* by bylo také možné studováním identity embryí pomocí mikrosatelitů. (Ludwig et al. 2013) Díky takovému postupu by bylo možné identifikovat přínos rodičů i v homoploidních kříženích.

6 Závěr

Uskutečněná experimentální křížení jasně potvrdila, že zástupci rodu *Sorbus* kombinují široké spektrum reprodukčních strategií. Jedná se o klasické sexuální rozmnožování, autogamii a různé druhy pseudogamie za účasti redukovaných i neredukovaných gamet mateřské rostliny i námi dodaného otcovského jedince. Tyto strategie se liší na úrovni jednotlivých kombinací. Mezidruhovú hybridizace se nejúspěšněji uskutečnila u křížení základních druhů mezi *S. aria* agg. a *S. aucuparia*, a při zpětném křížení hybridogenních taxonů s rodiči mezi *S. latifolia* agg. a *S. aria* agg.

Přibližně polovina námi uskutečněných kombinací plody a semena netvořila. Přesto potomci vznikali napříč všemi možnými kombinacemi křížení základních druhů i hybridogenních druhů s jejich rodiči. Lze tedy tvrdit, že plodné jsou alespoň částečně všechny námi uskutečněné kombinace rodičovských druhů a hybridogenních agregátů.

Mnoho kombinací se nepodařilo obousměrně uskutečnit zvláště kvůli sezóně 2017, kdy byla většina opačných směrů křížení plánována. Ale i z výsledků které k dispozici jsou, je jasné, že křížení je asymetrické. Jinými slovy, pro volbu reprodukční strategie a vznik semen je velmi zásadní, kdo je donorem pylu a kdo matkou vznikajících semen. Například u zástupců *S. aria* agg. se při křížení se zástupci *S. latifolia* agg. ukázalo, že když je *S. aria* agg. donorem pylu, hybridizace mezi jedinci probíhá v mnohem větší míře než v opačném směru. Naopak tomu bylo při křížení se *S. sudetica* s. str., kde ale vzniklo velmi málo semen, proto nelze tento výsledek považovat za definitivní. Při křížení se *S. hybrida* agg. ani žádné plody na květenství ovlivněném pylem *S. aria* agg. nevznikly.

Nejvíce kombinací mezi hybridogenními taxony a rodičovskými druhy bylo uskutečněno v rámci *S. latifolia* agg. U tohoto agregátu se potvrdilo výlučné postavení *S. aria* agg., s jehož zástupci proběhlo jednoznačně více úspěšných hybridizací než s druhým rodičem *S. torminalis*, kde nebyla hybridizace v experimentu zaznamenána ani jednou. Stejně potvrzení zásadního významu *S. aria* agg. v hybridní evoluci rodu by se dalo předpokládat i u *S. sudetica* agg., kde se při křížení se *S. aria* agg. také uskutečnila hybridizace. Semen ale vzniklo velmi málo a druhý rodič, *S. chamaepespilus*, nebyl v experimentu k dispozici. Naproti tomu poslední hybridogenní agregát

S. hybrida agg. tvořil semena a hybridizoval jen se svým rodičem *S. aucuparia* a při kříženích se zástupci *S. aria* agg. netvořil semena ani v jednom směru křížení.

Při porovnávání situace v experimentálním křížení se situací ve volné přírodě můžeme konstatovat, že dominantní reprodukční strategie všech používaných druhů jsou srovnatelné. Ač v malých počtech, v experimentu se ukázala větší variabilita minoritních výsledků. Jedním ze zřejmých důvodů může být, že jsme v experimentu křížily druhy, jejichž část v současné době netvoří ve střední Evropě společné kontaktní zóny, a tak hybridizace mezi nimi není fyzicky možná. Lze se ale domnívat, že v minulosti se takové možnosti objevovaly. Jedním z příkladů je na našem území vyskytující se endemický *S. sudetica* s. str., jehož rodičovské druhy se v jeho okolí v současnosti nevyskytují.

Seznam použité literatury

- ALDASORO, J. J., C. AEDO, F.M. GARMENDIA, F. P. DE LA HOZ, AND C. NAVARRO. 2004. Revision of *Sorbus* subgenera *Aria* and *Torminaria* (Rosaceae-Maloideae). *Systematic Botany Monographs* 69: p.1-148.
- ANDERSON, E., AND G. L. STEBBINS JR. 1954. Hybridization as an Evolutionary Stimulus. *Evolution* 8: p.378-388.
- ANTONIUS, K., AND H. NYBOM. 1995. Discrimination between Sexual Recombination and Apomixes Automixis in a *Rubus* Plant Breeding Programme. *Heredifas* 123: 205-213.
- ASKER, S. E., AND L. JERLING. 1992. Apomixis in plants. CRC press, Boca Raton.
- BAILEY, J., Q. KAY, H. MCALLISTER, AND T. RICH. 2008. Chromosome Numbers in *Sorbus* L. (Rosaceae) in the British Isles. *Watsonia* 27: p.69-72.
- BERNÁTOVÁ, D., AND J. MÁJOVSKÝ. 2003. New endemic hybridogenous species of the genus *Sorbus* in the Western carpathians. *Biologia* 58: p.781-790.
- BÍLÁ, J. 2015. Zdroje variability v *Sorbus aria* agg. Univerzita Karlova v Praze.
- BRÄUTIGAM, S., AND W. GREUTER. 2007. A new treatment of *Pilosella* for the Euro-Mediterranean flora. *Willdenowia* 37: 123–137.
- BRIGGS, D., AND S. M. WALTERS. 2001. Proměnlivost a evoluce rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- CAMPBELL, C. S., C. W. GREENE, AND S.E. BERGQUIST. 1987. Apomixis and sexuality in three species of *Amelanchier*, shadbush (Rosaceae, Maloideae). *American Journal of Botany* 74: p.321-328.
- CAMPBELL, C. S., AND T. A. DICKINSON. 1990. Apomixis, Patterns of Morphological Variation, and Species Concepts in subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany* 15: p.124-135.
- CAMPBELL, C. S., M. J. DONOGHUE, B.G. BALDWIN, AND M.F. WOJCIECHOWSKI. 1995. Phylogenetic relationships in Maloideae (Rosaceae): evidence from sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and its congruence with morphology. *American Journal of Botany* 82: p.903-918.
- DOLEŽEL, J., J. GREILHUBER, AND J. SUDA. 2007. Flow Cytometry with plant cells. Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley, Weinheim.
- DOBEŠ, CH., AND J. PAULE. 2010. A comprehensive chloroplast DNA-based phylogeny of the genus *Potentilla* (Rosaceae): implications for its geographic origin, phylogeography and generic circumscription. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 156-175.
- ELLSTRAND, N. C., R. WHITKUS, AND L.H. RIESEBERG. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: p.5090-5093.
- EVANS, R. C., AND C. S. CAMPBELL. 2002. The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. *American Journal of Botany* 89: p.1478-1484.
- FLEGR, J. 2009. Evoluční biologie. Academia, Praha.
- FROHNER, S. 1990. *Alchemilla*. In Conert, H. J., Hamann, U., Schultze-Motel, W. & Wagenitz, G. (ed.), *Gustav Hegi, Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, ed. 3, vol. IV 2B. Berlin: Parey.

- GABRIELIAN, E. T. 1978. The genus *Sorbus* L. in Eastern Asia and the Himalayas. Armenian Academy of Sciences, Yerevan. (* cit. dle Aldasoro et al., 2004).
- GALLARDO, M. H., J. W. BICKHAM, R. L. HONEYCUTT, R. A. OJEDA, AND N. KÖHLER. 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401: p.341.
- GIANFRANCESCHI, L., N. SEGLIAS, R. TARCHINI, M. KOMJANC, AND C. GESLER. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics* 96: p.1069-1076.
- GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, E. A., M. A. GONZÁLEZ-PÉREZ, E. RIVERO, AND P. A. SOSA. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Sorbus aria* (Rosaceae). *Conservation Genetics Resources* 2: p.341-343.
- GRIMANELLI, D., O. LEBLANC, E. PEROTTI, AND U. GROSSNIKLAUS. 2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in genetics* 17: p.597-604.
- HANUŠOVÁ, K. 2014. Endemický taxon Krkonoš *Campanula bohemica*: zhodnocení rizika hybridizace s *C. rotundifolia*. Univerzita Karlova v Praze.
- HEGARTY, M. J., AND S. J. HISCOCK. 2005. Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *The New phytologist* 165: p.411-423.
- HEGARTY, M. J., AND S.J. HISCOCK. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current biology* 18: p.435-444.
- HOLUB, J. 1995. *Rubus* L. In B. Slavík [ed.], Květena České republiky 4, Academia, Praha.
- HÖFER, M., AND A. MEISTER. 2010. Genome Size Variation in *Malus* Species. *Journal of Botany*: Article ID 480873.
- HÖRANDL, E. 2011. Evolution and biogeography of alpine apomictic plants. *Taxon* 60/ 2: p. 390-402(13).
- CHALLICE, J., AND M. KOVANDA. 1978. Flavonoids as markers of taxonomic relationships in the genus *Sorbus* in Europe. *Preslia* 50: p.305-320.
- CHEN, Z. J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual review of plant biology* 58: p.377-406.
- CHYTRÝ, M., J. DANIHELKA, S. KUBEŠOVÁ, P. LUSTYK, N. ERMAKOV, M. HÁJEK, P. HÁJKOVÁ, M. KOČÍ, Z. PREISLEROVÁ, J. ROLEČEK, M. ŘEZNÍČKOVÁ, P. SMARDA, M. VALACHOVIČ, D. POPOV, I. PIŠÚT. 2008. Diversity of forest vegetation across a strong gradient of climatic continentality: Western Sayan Mountains, southern Siberia. *Plant Ecology*. 196. 61-83.
- JANKUN, A., AND M. KOVANDA. 1986. Apomixis in *Sorbus sudetica* (Embryological studies in *Sorbus* 1). *Preslia* 58: p.7-19.
- JANKUN, A., AND M. KOVANDA. 1987. Apomixis and origin of *Sorbus bohemica* (Embryological studies in *Sorbus* 2). *Preslia* 59: p.97-116.
- KOCIÁNOVÁ, M., AND H. ŠTURSOVÁ. 1986. Revize rozšíření a ekologie jeřábu krkonošského (*Sorbus sudetica*). *Opera Corcontica* 23: p.77-110.
- KOCIÁNOVÁ, M., H. ŠTURSOVÁ, AND J. ZAHRADNÍKOVÁ. 2005. Klonální růst endemického jeřábu *Sorbus sudetica* v Krkonoších. *Opera Corcontica* 42: p.99-105.
- KOVANDA, M. 1959. Proměnlivost muku v ČSR. Univerzita Karlova v Praze.
- KOVANDA, M. 1961. Flower and fruit morphology of *Sorbus* in correlation to the taxonomy of the genus. *Preslia* 33: p.1-16.
- KOVANDA, M. 1965. Taxonomie jeřábu sudetského (*Sorbus sudetica* (Tausch) Hedl.) a otázka jeho endemismu. *Československá ochrana přírody* 2: p.47-83.

- KOVANDA, M. 1992. *Sorbus* L. In S. Hejný, and B. Slavík (ed.), Květena České republiky 3, 474 - 484. Academia, Praha.
- KOVANDA, M. 1999. Jeřáby (*Sorbus*) České republiky a jejich ochrana. *Příroda* 15: p.31-47.
- KOVANDA, M. 2002. *Sorbus* L. In K. Kubát, L. Hrouda, J. Chrtek Jr, Z. Kaplan, J. Kirschner, and J. Štěpánek [eds.], Klíč ke květeně České republiky, 383-386. Academia, Praha.
- KRAHULCOVÁ, A., J. CHRTEK, AND, F. KRAHULEC. 1999. Autogamy in *Hieracium* subgen. *Pilosella*. *Folia geobotanica* 34: 373-376.
- KRAHULCOVÁ, A., AND F. KRAHULEC. 2000. Offspring diversity in *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae): new cytotypes from hybridization experiments and from open pollination. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 45: p.239-255.
- KRAHULCOVÁ, A., O. ROTREKLOVÁ, F. KRAHULEC, R. ROSENBAUMANOVÁ AND I. PLÁNIČKOVÁ. 2009. Enriching ploidy level diversity: the role of apomictic and sexual biotypes of *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae) that coexist in polyploid populations. – *Folia Geobotanica* 44: 281-306.
- KRAHULCOVÁ, A., AND O. ROTREKLOVÁ. 2010. Use of flow cytometry in research on apomictic plants. *Preslia* 82, 23-39.
- KUTZELNIGG, H. 1994. *Sorbus* L. In H. J. Conert, U. Hamann, W. Schultze-Motel, and G. Wagenitz [eds.], Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Band IV, Teil 2B, 249-448. Parey, Hamburg.
- LEPŠÍ, M., P. LEPŠÍ, P. VÍT, AND P. KOUTECKÝ. 2009. *Sorbus portae-bohemicae* and *Sorbus albensis*, two new endemic apomictic species recognized based on a revision of *Sorbus bohemica*. *Preslia* 81: p.63-89.
- LEPŠÍ, M., P. VÍT, P. LEPŠÍ, K. BOUBLÍK, AND J. SUDA. 2008. *Sorbus milensis*, a new hybridogenous species from northwestern Bohemia. *Preslia* 80: p.229-244.
- LEPŠÍ, M., P. LEPŠÍ, J. SÁDLO, P. KOUTECKÝ, P. VÍT AND P. PETŘÍK. 2013. *Sorbus pauca* species nova, the first endemic species of the *Sorbus hybrida* group for the Czech Republic. *Preslia* 85. 63-80.
- LEPŠÍ, M., P. KOUTECKÝ, J. BÍLÁ, P. LEPŠÍ, T. URFUS, T. C. G. RICH. 2018 in prep. Versatility of reproductive modes and ploidy level interactions in *Sorbus* (Malinae, 3 Rosaceae): playful youth and serious adults.
- LEPŠÍ, M., P. LEPŠÍ, P. KOUTECKÝ, J. BÍLÁ AND P. VÍT. 2015. Taxonomic revision of *Sorbus* subgenus *Aria* occurring in the Czech Republic. *Preslia* 87: p.109-162.
- LILJEFORS, A. 1953. Studies on propagation, embryology, and pollination in *Sorbus*. *Acta Horti Bergiani* 16: p.277-329.
- LILJEFORS, A. 1955. Cytological studies in *Sorbus*. *Acta Horti Bergiani* 17: p.47-113.
- LUDWIG, S., A. ROBERTSON, T.C.G. RICH, M. DJORDEVIC, R. CEROVIC, L. HOUSTON, S. S. HARRIS, S. J. HISCOCK. 2013. Breeding systems, hybridization and continuing evolution in Avon Gorge *Sorbus*. *Annals of Botany*, 111(4), 563–575.
- MÁJOVSKÝ, J. 1992. *Sorbus* L. emend. Crantz. In L. Bertová [ed.], Flora Slovenska IV/3, 401-446. Veda, Bratislava.
- MÁJOVSKÝ, J., AND D. BERNÁTOVÁ. 2001. New hybridogeneous subgenera of the genus *Sorbus* L. Emend. Crantz. *Acta horticultrurae et regioteclurae* 4: p.20-21.
- MATZK, F., A. MEISTER, AND I. SCHUBERT. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 21: p.97-108.

- MEUSEL, H., E. JÄGER, AND E. WEINERT. 1965. Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. Fischer Verlag, Jena.
- MIKOLÁŠ, V. 2003. *Sorbus amici-petri* MIKOLÁŠ, a new hybridogenous species of the genus *Sorbus* s.l. from eastern Slovakia. *Thaiszia - Journal of Botany* 12: p.127-133.
- MRÁZ, P. 2003. Mentor effects in the genus *Hieracium* S.STR. (*Compositae*, *Lactuceae*). *Folia Geobotanica*. 38. 345-350.
- MRÁZ, P., AND P. ZDVOŘÁK. 2018. Reproductive pathways in *Hieracium* s.s. (*Asteraceae*): strict sexuality in diploids and apomixis in polyploids. *Annals of Botany* XX: 1–13, 00.
- NÄGELI, C. AND A. PETER. 1885. Die Hieracien Mittel-europas. – Monographische Bearbeitung der Piloselloiden mit besonderer Berücksichtigung der mitteleuropäischen Sippen, München.
- NELSON-JONES, B., D. BRIGGS, AND G. SMITH. 2002. The origin of intermediate species of the genus *Sorbus*. *Theoretical and applied genetics* 105: p.953-963.
- ODDOU-MURATORIO, S., C. ALIGON, S. DECROOCQ, C. PLOMION, T. LAMANT, AND B. MUSHDEMESURE. 2001. Microsatellite primers for *Sorbus torminalis* and related species. *Molecular Ecology Notes* 1: p.297-299.
- PFOSSER, M. ET AL. 2006. Evolution of *Dystaenia takesimana* (*Apiaceae*), endemic to Ullung Island, Korea. *Plant Systematics and Evolution* 256: p.159-170
- RAMSEY, J., AND D. W. SCHEMSKE. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual review of Ecology and Systematics* 29: p.467-501.
- RICH, T.C.G., S.A. HARRIS, AND S.J. HISCOCK. 2009a. Five new *Sorbus* (*Rosaceae*) taxa from the Avon Gorge, England. *Watsonia* 27: p.217-228.
- RICH, T.C.G., L. HOUSTON, A. ROBERTSON, AND M.C.F. PROCTOR. 2010. Whitebeams, Rowans and Service Trees of Britain and Ireland. A monograph of British and Irish *Sorbus* L. B.S.B.I. Handbook No. 14. Botanical Society of the British Isles, London.
- RICH, T. C. G. ET AL. 2014. British *Sorbus* (*Rosaceae*): six new species, two hybrids and a new subgenus. *New Journal of Botany* vol. 4 no. 1: p.2-12.
- RICHARDS, A. J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 358: p.1085-1093.
- RIESEBERG, L. H., AND S. E. CARNEY. 1998. Plant hybridization. *New Phytologist* 140: p.599-624.
- RIESEBERG, L. H., AND J. H. WILLIS. 2007. Plant Speciation. *Science* 317: p.910-914.
- ROBERTSON, A., AND C. SYDES. 2006. *Sorbus pseudomeinichii*, a new endemic *Sorbus* (*Rosaceae*) microspecies from Arran, Scotland. *Watsonia* 26: p.9-14.
- ROBERTSON, A. ET AL. 2010. Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. *Molecular ecology* 19: p.1675-1690.
- SHAPIRO, H. 2004. Practical flow cytometry. Wiley-Liss, New York.
- SOLTIS, D.E., V.A. ALBERT, J. LEEBENS-MACK, C.D. BELL, A.H. PATERSON, C. ZHENG, D. SANKOFF, C.W. DEPAMPHILIS, P.K. WALL, AND P. SOLTIS. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American journal of botany* 96: p.336-48.

- STEBBINS, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold (Publishers), London.
- SUDA, J. 2009. Darwinova "odporná záhada" po 130 letech aneb souvisí polyploidie s rozmanitostí krytosemenných rostlin? *Živa* 5: p.204-208.
- TUTIN, T. G., V.H. HEYWOOD, N. A. BURGESS, D. M. MOORE, D. H. VALENTINE, S. M. WALTERS, AND D. A. WEBB (ed.). 1968. *Flora Europaea*, 2. Cambridge.
- VÍT, P. 2006. Variabilita endemických zástupců rodu *Sorbus* L. v ČR: morfometrické, karyologické a molekulární zhodnocení. Univerzita Karlova v Praze.
- VÍT, P., M. LEPŠÍ, AND P. LEPŠÍ. 2012. There is no diploid apomict among Czech *Sorbus* species: a biosystematic revision of *S. eximia* and discovery of *S. barrandienica*. *Preslia* 84: p.71–96.
- VÍT, P., AND J. SUDA. 2006. Endemické jeřáby - perly mezi českými dřevinami. *Živa* 6: p.251-255.
- VERBYLAITE, R., B. FORD-LLOYD, J. NEWBURY. 2006. The phylogeny of woody Maloideae (Rosaceae) using chloroplast *trnL-trnF* sequence data. *Bijologia* Nr.1: p60-63.
- WARBURG, E.F., AND Z.E. KÁRPÁTI. 1968. *Sorbus* L. In T. G. Tutin et al. [eds.], *Flora Europaea*, Vol.2, Rosaceae to Umbelliferae, 67-70. Cambridge University Press, Cambridge.
- WHITTON, J., C.J. SEARS, E.J. BAACK, AND S.P. OTTO. 2008. The dynamic nature of apomixis in the angiosperms. *International Journal of Plant Sciences* 169: p.169-182.
- ZHANG, S. D., J. J. JIN, S. Y. CHEN, M. W. CHASE, D. E. SOLTIS, H. T. LI, J. B. YANG, D. Z. LI, AND T. S. YI. 2017. Diversification of Rosaceae since the Late Cretaceous Based on Plastid Phylogenomics. *New Phytologist* 214(3): p.1355–67.

Příloha 1: Tabulka původu stromů používaných v hybridizačním experimentu. První dva sloupce udávají údaje z pozičních map (PM) Den-dorlogické zahrady v Průhonicích, třetí sloupec obsahuje naše číselné označení, dále používané v molekulárních analýzách. Nešlo vždy o všechny existující stromy ze sbírky, proto množství těchto čísel neodpovídá celkovému počtu stromů uvedeného v pátém sloupci.

plocha	číslo v PM	naše čísla	druh	původ
O-II	215	421, 422	<i>S. hybrida</i>	2 zámecký park v Průhonicích, část zvaná Zítovka, číslo stromu 183/G-257/1, VI/12, semenáče
O-II	248	424	<i>S. bohemica</i>	5 zámecký park v Průhonicích, část zvaná Zítovka, číslo stromu 183/G-212/29, IX/48, roubovanci, na Zítovku získán jako semenáč z typové lokality druhu - z vrchu Lovoš v Českém středohoří
O-II	152	425	<i>S. xdecipiens</i>	1 botanická zahrada Wageningen, Nizozemsko, roubovanec
O-II	197	426	<i>S. torminalis</i>	3 VÚLHM, v. v. i., Kostelany, semenáče
O-II	26	430	<i>S. aria</i>	1 NP Podyjí, Ledové sluje, semenáč
O-II	25	431	<i>S. aria</i>	1 NP Podyjí, Ledové sluje, semenáč
N-I	178	428, 429	<i>S. danubialis</i>	3 NP Podyjí, Hardeggská stráň, semenáče
N-II	163	427	<i>S. pauca</i>	1 Bezděz (okres Česká Lípa), úpatí kopce Malý Bezděz, roubovanec
N-I	187	432	<i>S. eximia</i>	1 Srbsko (okres Beroun), NPR Koda v Českém krasu, semenáč
G-II	3	402 - 409	<i>S. aria</i>	8 NP Podyjí, Ledové sluje, semenáče
G-II	11	416	<i>S. gemella</i>	2 Konětopy (okres Louny), opuková stráň nad obcí, typová lokalita druhu, semenáče
G-II	5	417 - 419	<i>S. cucullifera</i>	9 NP Podyjí, Hardeggská stráň, semenáče
G-II	2	410,411,413-415	<i>S. danubialis</i>	5 Jamolice (okres Znojmo), zřícenina hradu Templštejn, semenáče
G-II	10	412	<i>S. xdecipiens</i>	1 NP Podyjí, Ledové sluje, semenáč
G-II	4	432	<i>S. eximia</i>	6 Srbsko (okres Beroun), NPR Koda v Českém krasu, semenáče
u GII	?	400	<i>S. aucuparia</i>	1 neznámého původu
u GII	?	401	<i>S. sudetica</i>	1 Krkonoše, Obří Důl
L-I	78	420	<i>S. margittaiana</i>	7 Slovensko, Malá Fatra, Suchý vrch

Příloha 2: Vybraná a uskutečněná křížení včetně opakování. První část tabulky obsahuje pouze kontrolní samoopylení květenství, pro kontrolu selfinkompatibility a také křížení s *Malus sargentii*, která měla pomoci odhalit přítomnost mentor efektu. Kromě druhového jména a ploidie obsahuje tabulka také údaje o příslušnosti daných druhů k jednotlivým hybridogenním agregátům nebo základním druhům: A – *S. aria* agg., AU – *S. aucuparia*, H – *S. hybrida* agg., L – *S. latifolia* agg., T – *S. torminalis*, M – *Malus sargentii*, MA – trihybrid *S. margittaiana*.

matka			otec		
druh	ploidie	agg.	druh	ploidie	agg.
<i>×decipiens</i>	2	L	<i>×decipiens</i>	2	L
<i>×decipiens</i>	2	L	<i>×decipiens</i>	2	L
<i>alnifrons</i>	3	L	<i>alnifrons</i>	3	L
<i>alnifrons</i>	3	L	<i>alnifrons</i>	3	L
<i>aria</i>	2	A	<i>aria</i>	2	A
<i>aria</i>	2	A	<i>aria</i>	2	A
<i>aria</i>	2	A	<i>aria</i>	2	A
<i>aucuparia</i>	2	AU	<i>aucuparia</i>	2	AU
<i>aucuparia</i>	2	AU	<i>aucuparia</i>	2	AU
<i>bohémica</i>	3	L	<i>bohémica</i>	3	L
<i>bohémica</i>	3	L	<i>bohémica</i>	3	L
<i>cucullifera</i>	3	A	<i>cucullifera</i>	3	A
<i>danubialis</i>	4	A	<i>danubialis</i>	4	A
<i>gemella</i>	3	L	<i>gemella</i>	3	L
<i>hybrida</i>	4	H	<i>hybrida</i>	4	H
<i>pauca</i>	4	H	<i>pauca</i>	4	H
<i>sudetica</i>	4	S	<i>sudetica</i>	4	S
<i>sudetica</i>	4	S	<i>sudetica</i>	4	S
<i>sudetica</i>	4	S	<i>sudetica</i>	4	S
<i>sudetica</i>	4	S	<i>sudetica</i>	4	S
<i>sudetica</i>	4	S	<i>sudetica</i>	4	S
<i>torminalis</i>	2	T	<i>torminalis</i>	2	T
<i>torminalis</i>	2	T	<i>torminalis</i>	2	T
<i>×decipiens</i>	2	L	<i>malus</i>	4	M
<i>aria</i>	2	A	<i>sudetica</i>	4	S
<i>aucuparia</i>	2	AU	<i>malus</i>	4	M
<i>bohémica</i>	3	L	<i>malus</i>	4	M
<i>hybrida</i>	4	H	<i>malus</i>	4	M
<i>sudetica</i>	4	S	<i>malus</i>	4	M
<i>torminalis</i>	2	T	<i>malus</i>	4	M

matka			otec		
druh	pl	agg	druh	pl	agg
×decipiens	2	L	aria	2	A
×decipiens	2	L	aria	2	A
×decipiens	2	L	aria	2	A
×decipiens	2	L	torminalis	2	T
aria	2	A	×decipiens	2	L
aria	2	A	×decipiens	2	L
aria	2	A	×decipiens	2	L
aria	2	A	aucuparia	2	AU
aria	2	A	aucuparia	2	AU
aria	2	A	bohemica	4	L
aria	2	A	bohemica	3	L
aria	2	A	bohemica	3	L
aria	2	A	cucullifera	3	A
aria	2	A	cucullifera	3	A
aria	2	A	danubialis	4	A
aria	2	A	hybrida	4	H
aria	2	A	sudetica	4	S
aria	2	A	sudetica	4	S
aria	2	A	torminalis	2	T
aucuparia	2	AU	aria	2	A
aucuparia	2	AU	danubialis	4	A
aucuparia	2	AU	hybrida	4	H
aucuparia	2	AU	hybrida	4	H
aucuparia	2	AU	pauca	4	H
aucuparia	2	AU	torminalis	2	T
aucuparia	2	AU	torminalis	2	T
bohemica	3	L	aria	2	A
bohemica	3	L	aria	2	A
bohemica	3	L	danubialis	4	A
bohemica	3	L	danubialis	4	A
bohemica	3	L	torminalis	2	T
bohemica	3	L	torminalis	2	T
bohemica	3	L	torminalis	2	T
cucullifera	3	A	aria	2	A
cucullifera	3	A	aria	2	A
cucullifera	3	A	danubialis	4	A

matka			otec		
druh	pl	agg	druh	pl	agg
cucullifera	3	A	torminalis	2	T
danubialis	4	A	aria	2	A
danubialis	4	A	aria	2	A
danubialis	4	A	aucuparia	2	AU
danubialis	4	A	bohemica	3	L
danubialis	4	A	cucullifera	3	A
danubialis	4	A	hybrida	4	H
danubialis	4	A	margittaiana	4	MA
danubialis	4	A	sudetica	4	S
danubialis	4	A	torminalis	2	T
eximia	3	L	aria	2	A
eximia	3	L	eximia	3	L
gemella	3	L	aria	2	A
gemella	3	L	danubialis	4	A
gemella	3	L	torminalis	2	T
hardegensis	2	L	cucullifera	3	A
hybrida	4	H	aria	2	A
hybrida	4	H	aucuparia	2	AU
hybrida	4	H	aucuparia	2	AU
hybrida	4	H	danubialis	4	A
margittaiana	4	MA	danubialis	4	A
pauca	4	H	aria	2	A
sudetica	4	S	aria	2	A
sudetica	4	S	aria	2	A
torminalis	2	T	×decipiens	2	L
torminalis	2	T	×decipiens	2	L
torminalis	2	T	aria	2	A
torminalis	2	T	aria	2	A
torminalis	2	T	aucuparia	2	AU
torminalis	2	T	aucuparia	2	AU
torminalis	2	T	bohemica	3	L
torminalis	2	T	bohemica	3	L
torminalis	2	T	danubialis	4	A
torminalis	2	T	danubialis	4	A
torminalis	2	T	eximia	3	L
torminalis	2	T	eximia	3	L

Příloha 3: Přehled koncentrací DNA vzorků získaných izolací z čepelí listů.

V posledních dvou sloupcích je výpočet pro ředění, které bylo potřeba pro další práci se vzorky.

					ředění na 10ngDNA ve 20ul	
Sample ID	Druh	ng/ul	260/280	260/230	vzorku	vody
400	<i>S. aucuparia</i>	113,4	1,99	1,83	4,4	45,6
401	<i>S. sudetica</i>	103,79	1,99	1,8	4,8	45,2
402	<i>S. aria</i>	299,33	2,01	1,99	1,7	48,3
403	<i>S. aria</i>	373,03	1,97	1,9	1,3	48,7
404	<i>S. aria</i>	286,54	1,97	1,75	1,7	48,3
405	<i>S. aria</i>	401,67	1,95	2,14	1,2	48,8
406	<i>S. aria</i>	136,25	2,01	1,85	3,7	46,3
407	<i>S. aria</i>	237,78	2,01	1,83	2,1	47,9
408	<i>S. aria</i>	402,24	1,99	2,05	1,2	48,8
409	<i>S. aria</i>	245,23	1,99	1,96	2,0	48,0
410	<i>S. danubialis</i>	420,07	1,98	2,18	1,2	48,8
411	<i>S. danubialis</i>	441,34	1,92	2,12	1,1	48,9
412	<i>S. xdecipiens</i>	295,57	1,92	2,18	1,7	48,3
413	<i>S. danubialis</i>	267,47	1,93	2,06	1,9	48,1
414	<i>S. danubialis</i>	97,99	1,99	2,34	5,1	44,9
415	<i>S. danubialis</i>	398,49	1,9	2,25	1,3	48,7
416	<i>S. gemela</i>	370,69	1,88	2,21	1,3	48,7
417	<i>S. cucullifera</i>	228,35	1,94	2,02	2,2	47,8
418	<i>S. cucullifera</i>	275,41	1,9	2,01	1,8	48,2
419	<i>S. cucullifera</i>	289,13	1,95	1,96	1,7	48,3
420	<i>S. margittaiana</i>	118,75	1,88	1,71	4,2	45,8
421	<i>S. hybrida</i>	322,79	1,94	2,06	1,5	48,5
422	<i>S. hybrida</i>	441,68	1,95	2,14	1,1	48,9
423	<i>S. bohémica</i>	247,75	1,93	1,95	2,0	48,0
424	<i>S. bohémica</i>	305,54	1,94	2,05	1,6	48,4
425	<i>S. xdecipiens</i>	224,78	1,89	1,86	2,2	47,8
426	<i>S. torminalis</i>	201,33	1,94	2,03	2,5	47,5
427	<i>S. pauca</i>	346,52	1,96	1,95	1,4	48,6
428	<i>S. danubialis</i>	447,12	1,96	2,13	1,1	48,9
429	<i>S. danubialis</i>	822,69	1,96	1,93	0,6	49,4
430	<i>S. aria</i>	418,06	1,94	1,99	1,2	48,8
431	<i>S. aria</i>	843,89	1,92	1,81	0,6	49,4
432	<i>S. eximia</i>	1230,47	1,97	2,06	0,4	49,6
Z	<i>S. collina (?)</i>	152,19	1,93	1,46	3,3	46,7